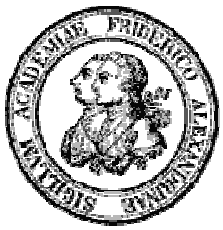
Aus der Medizinischen Klinik II
der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. W.G. Daniel

Der FcγRIIa-R/R131 Genotyp ist mit dem Auftreten von instabiler Angina pectoris als Erstmanifestation der Koronaren Herzkrankheit assoziiert

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
an der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Monika Kallmünzer
aus Erlangen



Gedruckt mit Erlaubnis der

Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schüttler
Referent:	Prof. Dr. med. C. Garlichs
Korreferent:	Prof. Dr. med. W.G. Daniel
Tag der mündlichen Prüfung:	22. Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung

1.1 Hintergrund und Ziele 1

1.2 Methoden 1

1.3 Ergebnisse und Beobachtungen 1

1.4 Praktische Schlussfolgerungen 2

2 Einleitung

2.1 Atherogenese 3

2.1.1 Endotheliale Dysfunktion 3

2.1.2 „Fatty-Streak“-Läsionen 5

2.1.3 Plaqueformation 5

2.1.4 Plaqueruptur 7

2.1.5 Angina pectoris als Manifestation der koronaren Herzerkrankung

2.1.5.1 Stabile Angina pectoris 10

2.1.5.2 Instabile Angina pectoris 10

2.2 Atherosklerose als Entzündungskrankheit 11

2.3 C-reaktives Protein 11

2.3.1 Regulation der CRP-Expression 12

2.3.2 Struktur des CRP 12

2.3.3 Funktion des CRP 14

2.4 CRP-Gen

2.4.1 Struktur 16

2.4.2 Polymorphismen des CRP Gens 16

2.4.2.1 Einfluss auf den Plasma-CRP-Spiegel 17

2.4.2.2 Single nucleotide polymorphisms (SNPs) 18

2.4.2.3 Triallelischer SNP rs3091244 18

2.4.3 CRP-Genotyp und Ethnizität 18

2.5 CRP-Rezeptoren: Fcγ-Polymorphismus

2.5.1 Struktur 19

2.5.1.1 FcγRIa (CD64) 20

2.5.1.2 FcγRII (CD32) 20

2.5.1.3 FcγRIII (CD16) 21
2.5.2 Funktion 21
2.5.3 FcγR-Polymorphismen 23
2.5.3.1 FcγRIa 23
2.5.3.2 FcγRIIa 23
2.5.3.3 FcγRIIIa 24
2.5.3.4 FcγRIIIb 24
2.5.4 Klinische Relevanz der FcγR-Polymorphismen 24
2.6 Rolle des CRP als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen 26
2.7 Fragestellung der Arbeit und Pilotstudie 28

3 Material und Methoden 31
3.1 Definition der Studiengruppen
3.1.1 Kontrollgruppe 31
3.1.2 Gruppe „Stabile Angina Pectoris“ 31
3.1.3 Gruppe "Instabile Angina Pectoris” 32
3.2 Ausschlusskriterien der Studie 32
3.3 Standardisierte Blutentnahme 32
3.4 Weiterverarbeitung des Blutes 33
3.4.1 Monozytenextraktion 33
3.4.2 DNA-Isolation 34
3.4.3 Photometrische Bestimmund der Nukleinsäuren 35
3.4.4 Genotypisierung des FcγRIIa/131-Polymorphismus mittels „nested-PCR“ 36
3.5 Statistische Analysen 38

4 Resultate
4.1 Patientencharakteristik 39
4.2 Analyse des FcγRIIa-Rezeptors (rs1801274) 41
4.3 Analyse des CRP-Gen 2667C-Allels (rs1800947) 43
4.4 Analyse des CRP-Gen 1919T-Allels (rs1417938) 45
4.5 Analyse des CRP-Gen 1440-ACT-Allels (rs3091244) 47
4.6 Multivariate Analyse 50

5 Diskussion
5.1 Besprechung der Ergebnisse 51
5.2 Ausblick 54

6 Literaturverzeichnis 56

7 Abkürzungsverzeichnis 80

8 Danksagung 83

9 Lebenslauf 84

Zusammenfassung

1 Hintergrund und Ziele

Das C-reaktive Protein fungiert als potenter Prädiktor des kardiovaskulären Risikos. Für seinen Hauptrezeptor FcγRIIa, der auf den meisten myeloiden Zellen exprimiert wird, ist ein Polymorphismus an Aminosäureposition 131 beschrieben. Hier kommt es bei homozygotem Vorliegen zweier Arginin-Allele (R/R) zu hoher und bei Homozygotie zweier Histidin-Allele (H/H) zu niedriger Bindungsaffinität. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) innerhalb des CRP-Gens sind verantwortlich für die interindividuelle Variabilität des Basis-CRP-Spiegels. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des FcγRIIa-Polymorphismus sowie dreier SNPs des CRP-Gens auf den Verlauf der Koronaren Herzerkrankung zu untersuchen.

2 Methoden

In vorliegende Studie gingen insgesamt Daten von 1035 Patienten ein (504 mit stabiler Angina pectoris [SAP], 332 mit instabiler Angina pectoris [IAP] und 199 gesunde Kontrollprobanden [non-CAD]). Die Eingruppierung in die Studienkollektive wurde primär hinsichtlich der klinischen Erstmanifestation vorgenommen. Nach standardisierter Blutentnahme erfolgte die Monozytenextraktion aus den Natrium-Citrat-antikoagulierten Blutproben nach dem Prinzip der Ficoll-Auftrennung. Die anschließende DNA-Isolation wurde zur Optimierung der Vergleichbarkeit mit Hilfe des „Wizzard Genomic DNA Purification Kit“ von Promega durchgeführt. Nach photometrischer Bestimmung des Nucleinsäure-Gehalts der Proben folgte schließlich die Genotypisierung mittles Nested-PCR nach einer modifizierten Methode von Carlsson et al (Carlsson LE et al., 1998). Die statistische Analyse wurde mit SPSS-Software durchgeführt und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von <0,05 als statistisch signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse und Beobachtungen

Der FcγRIIa R/R131-Genotyp zeigte in der Patientengruppe IAP eine signifikant höhere Frequenz verglichen mit der Gruppe SAP und dem Kontrollkollektiv. Der

Rezeptor-Genotyp FcγRIIa H/H131 hingegen wies im Studienkollektiv SAP ein signifikant häufigeres Vorkommen auf. In der Multivariaten-Analyse konnte bestätigt werden, dass der Genotyp R/R131 als Risikofaktor des instabilen Verlaufs der KHK von klassischen atherogenen Risikofaktoren unabhängig ist. Die Genotypisierung der Patientenkollektive hinsichtlich der CRP-Gen SNPs rs3091244, rs1800947 sowie rs1417938 zeigte eine annähernde Gleichverteilung der Genvarianten in den Kollektiven SAP, IAP und Kontrollen.

4 Praktische Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie konnten wir eine starke Assoziation zwischen dem FcγRIIa R/R131-Genotyp und der Ausprägung einer instabilen AP als Erstmanifestation der KHK nachweisen. Der Subtyp H/H131 scheint eher einen stabilen Verlauf der KHK zu mediieren. Da das CRP via FcγRIIa R/R131 mit starker Bindungsavidität den Prozess der Atherogenese entscheidend mitbeeinflusst, vermuten wir eine Prädisposition der Patienten mit R/R131 Genotyp für eine frühe Plaquedestabilisierung und somit für einen von Anfang an instabilen Verlauf. Eine zukünftige Verbesserung der Risikostratifizierung auf dem Gebiet der KHK durch nichtinvasive Identifikation von Hochrisikopatienten mittels Genotypisierung verspräche die Senkung der Mortalität der KHK als Haupttodesursache der industrialisierten Welt.

2 Einleitung

2.1 Atherogenese

Trotz intensiver Bemühungen sowohl auf dem Gebiet der Grundlagen- als auch der klinischen Forschung stellt die Atherosklerose mit ihren klinischen Manifestationen die Haupttodesursache der industrialisierten Welt dar. Die Atherosklerose ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques haben sowohl Lebensgewohnheiten und Umwelteinflüsse als auch bisher wenig erforschte genetische Determinanten, was in wichtigen epidemiologischen Studien wie der MONICA- oder der Framingham-Studie bereits belegt wurde (Koenig W et al., 2004; Tunstall-Pedoe H et al., 1999).
Eine bedeutende Manifestation der Atherosklerose ist die koronare Herzkrankheit, die sich durch Progression und Destabilisation atherosklerotischer Plaques auszeichnet. Dieser über Jahre fortschreitende Prozess beginnt asymptomatisch im Kindesalter und führt im mittleren und hohen Alter zu typischen Endorganschädigungen. Klinisch mündet er in dem akuten Koronarsyndrom (AKS), welches die instabile Angina Pectoris, den akuten Nicht-ST-Hebungs- und den akuten ST-Hebungs-Myokardinfarkt einschließt.

2.1.1 Endotheliale Dysfunktion

Die Atherogenese ist ein in mehreren Stufen ablaufender Prozess, der insbesondere große und mittelgroße elastische sowie muskuläre Arterien betrifft und mit einer endothelialen Dysfunktion beginnt (Ross, 1999).
Vermittelt durch Prostacyclin, Angiotensin II, Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin und von Thrombozyten stammenden Wachstumsfaktoren (PDGF, platelet derived growth factor) kommt es zur gesteigerten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und Plasmabestandteile (Ross, 1999). Der daraus resultierende oxidative Stress ist für jedes Stadium der Atherosklerose pathophysiologisch von Bedeutung. Durch Schädigung und Veränderung der Oberflächeneigenschaften des Endothels kommt es durch von Endothelzellen gebildeten von-Willebrand-Faktor

(vWF) und durch Glykoprotein Ib der Thrombozyten zur sofortigen Thrombozytenadhäsion an freigelegtes Kollagen (Davi G et al., 2007). Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Nikotinabusus und Diabetes mellitus sind mit der Thrombozytenaktivation und der verstärkten Freisetzung des CD40-Liganden assoziiert (Harding SA et al., 2004). Weiterhin erfolgt eine Migration von Leukozyten in die Arterienwand, welche durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothel und Leukozyten begünstigt wird (Davi G et al., 2007).

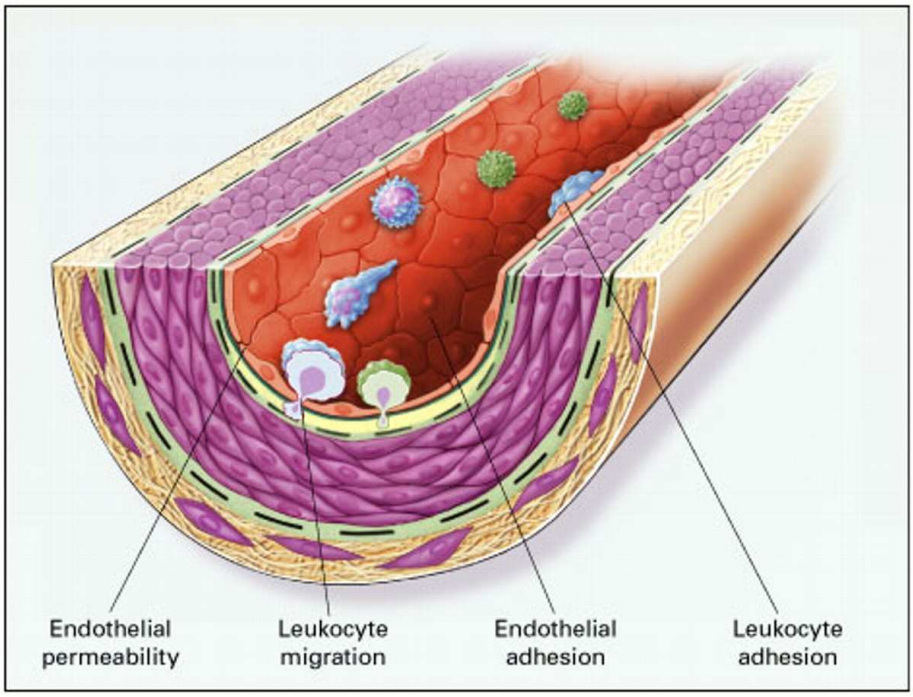


Abb. 1: Schema der endothelialen Dysfunktion (modifiziert nach Ross, 1999)

2.1.2 „Fatty-Streak“-Läsionen

„Fatty-Streak“-Läsionen entstehen durch Einlagerung von LDL (low density lipoproteine) in die Gefäßwand und anschließender Oxidation durch Wechselwirkungen mit Enzymen wie Sphingomyelinase und Phospholipase A2 sowie Sauerstoffradikalen (Ross, 1999). Die Anwesenheit von HDL (high density lipoproteine) wirkt diesem Vorgang protektiv entgegen. LDL-Partikel können durch Makrophagen über deren Scavenger-Rezeptoren aufgenommen werden (Steinberg D, 1997), was die Akkumulation von Cholesterol-Estern erleichert und somit zur Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen (foam cells) führt. Durch das Einwandern von T-Lymphozyten und aus Monozyten der Blutbahn entstandenen Makrophagen entsteht schließlich eine inflammatorische Läsion. Oxidiertes LDL wirkt auch als Mediator für die Migration von Monozyten und T-Lymphozyten in die Arterienwand und kann die Expression von Genen hochregulieren, die für den Macrophage Colony Stimulation Faktor (Quinn MT, 1987) sowie das Monocyte Chemotactic Protein (Leonard EJ, 1990) kodieren, wodurch die inflammatorische Antwort potenziert wird. Weiterhin wird durch LDL die Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion in der Gefäßwand inhibiert und somit der entscheidende vasodilatatorische und antiatherosklerotische Effekt abgeschwächt. Sezernierte Wachstumsfaktoren wie der PDGF lassen die glatten Gefäßmuskelzellen in der so entstandenen Neointima proliferieren (Ross, 1999).
Mediatoren der Inflammation wie Tumornekrosefaktor α, Interleukin-1 und Macrophage Colony Stimulating Factor unterstützen die Bindung von LDL an das Endothel und glatte Muskelzellen und erhöhen die Transkription des LDL-Rezeptor-Gens (Stopeck AT, 1993). Somit kann ein Teufelskreis aus Inflammation, Modifizierung von Lipoproteinen und weiterer Inflammation innerhalb der Arterie durch die Anwesenheit solcher Lipide aufrechterhalten werden (Ross, 1999).

2.1.3 Plaqueformation

Im Stadium der Plaqueformation kommt es zur weiteren Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten und insbesondere glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und zu deren Proliferation. Dies geht einher mit einer

gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrixmoleküle, was auch als eine zentrale Verbindung zwischen Inflammation und Plaqueinstabilität angesehen wird (Shah PK et al, 2001).

Die eingelagerten Lipide, der Zellreichtum und die gesteigerte Produktion extrazellulärer Matrix verursachen eine Raumforderung in Bereich des Endothels, schränken das Gefäßlumen ein und behindern den Blutfluss. Der Plaque wird meist durch eine fibröse Kappe und die darüberliegende Endothelschicht vom Gefäßlumen abgeschirmt. Der Kern des Plaque besteht aus zerfallenen Schaumzellen, freigesetzten extrazellulären Lipiden und Leukozyten (Ross, 1999).

Thrombozyten können Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese sezernieren und spielen somit eine zentrale Rolle in diesem Stadium der Atherogenese (Davi G et al., 2007).

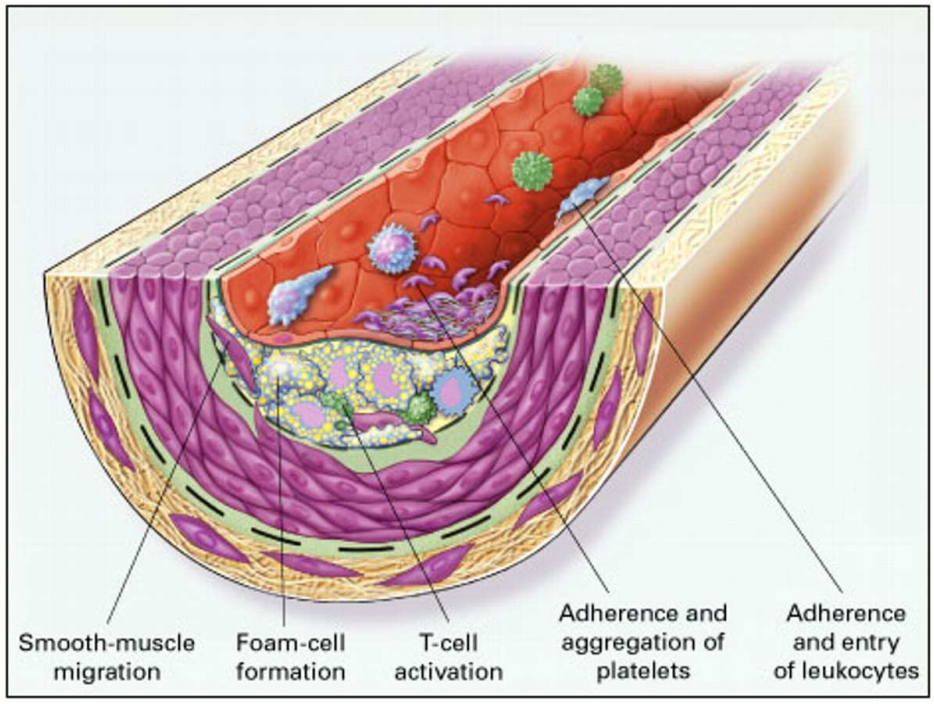


Abb. 2 Schema frühe atherosklerotische Läsion (modifiziert nach Ross, 1999)

2.1.4 Plaqueruptur

In der Vergangenheit wurde angenommen, der atherosklerotische Prozess führe unweigerlich zu einem kompletten Gefäßverschluss und der daraus resultierenden gefürchteten Myokardischämie. Heute wissen wir, dass der Grad der Stenosierung nicht mit der Rate auftretender Koronarereignisse korreliert (Libby, 2001). Vielmehr ist es die Ruptur eines instabilen Plaques, die das Zusammentreffen des hochthrombogenen Materials des Plaque-Kerns und freigesetztem „tissue factor“ mit vorbeiströmendem Blut ermöglicht. Tissue Factor (TF) ist ein transmembranes Glykoprotein (Edgington TS et al., 1991), das im atherosklerotischen Plaque hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wird und einen Hauptregulator des thrombogenen Potentials einer solchen Läsion darstellt (Toschi V et al., 1997). Sobald TF freigesetzt ist, aktiviert es als Cofaktor die Gerinnungskaskade (Rapaport SI, 1992), was zur Formation eines okkludierenden Thrombus führen kann (Mach F et al., 1997). Rupturgefährdete Plaques weisen typischerweise folgende Charakteristika auf: Sie besitzen eine dünne fibröse Kappe, eine hohe Anzahl inflammatorischer Zellen wie Makrophagen und einen substantiellen Lipidkern (Davies et al., 1993).

Von zentraler Bedeutung für die Größenzunahme des Plaque sind die Vermehrung von T-Lymphozyten und Makrophagen. Der Kontakt mit weiteren inflammatorischen Zytokinen wir Interferon-γ (IFN-γ) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) ist weiterhin entscheidend für die Aktivierung von Makrophagen sowie deren Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen oder Metalloproteinasen (Rosenfeld et al., 1990). Der zentrale Prozess bei der Ausbildung der nekrotischen Kernregion ist neben der Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen und dem Untergang von Schaumzellen eine erhöhte Rate an Apoptosen. In der darüber liegenden Schicht kommt es durch erhöhte Konzentrationen an PDGF (platelet derived growth factor), TGF-β (transforming growth factor-β), Interleukin-1, TNF-α und Osteopontin sowie der Akkumulation extrazellulärer Matrix und glatter Muskelzellen zur Formation einer fibrösen Kappe (Giachelli et al., 1998). Die strukturelle Integrität dieser Kappe ist von essentieller Bedeutung für die Plaquestabilität.

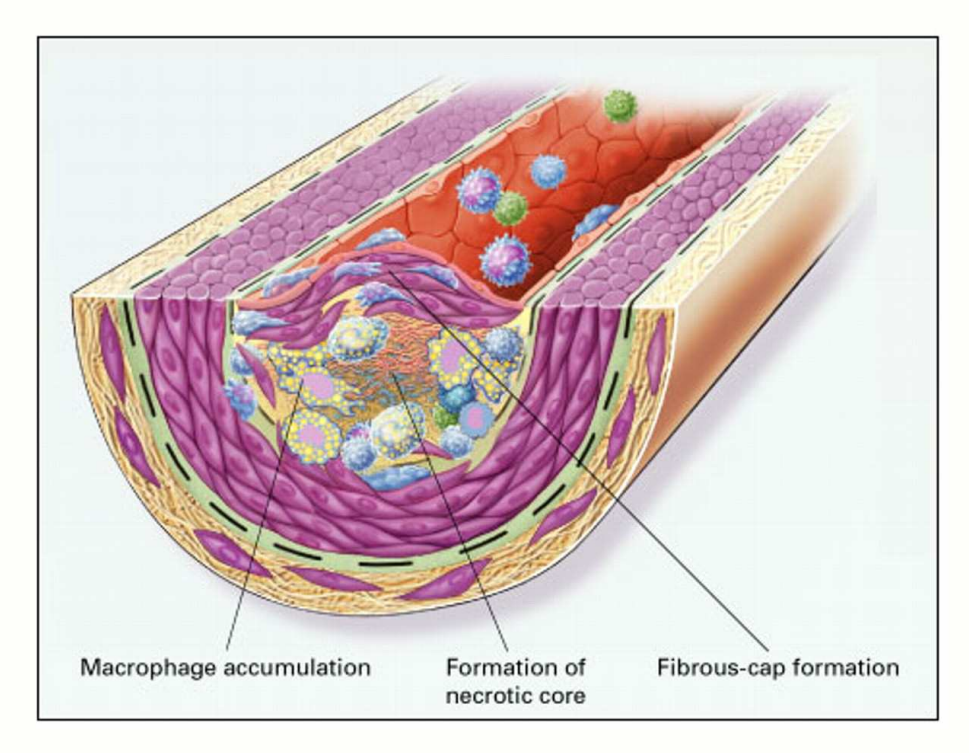


Abb.3: Fortgeschrittene atherosklerotische Läsion (modifiziert nach Ross, 1999)

Obwohl die Morphologie des Plaque gut erforscht und beschrieben ist, sind die exakten molekularen Mechanismen der Plaqueruptur weitgehend unklar. Wie in neueren Studien belegt, kann der Prozess der Kappenausdünnung sowie die Ruptur des vulnerablen Plaque mit einem Entzündungsprozess in Verbindung gebracht werden (Libby P, 1995).

Biomechanische, molekulare und zelluläre Phänomene tragen zur Instabilisierung atherosklerotischer Läsionen bei (Libby P, 1995). T-Lymphozyten innerhalb der Plaques initialisieren die inflammatorische Antwort, indem sie durch Freisetzung von Zytokinen wie IFN-γ, TNF-α und β die Kollagensynthese in glatten Muskelzellen vermindern sowie die Matrixmetalloproteinasen-Synthese der Makrophagen ankurbeln. Infolge werden sowohl weniger Kollagenfibrillen gebildet als auch bestehendes Kollagen und Elastin der extrazellulären Matrix des Plaque vermehrt abgebaut, die fibröse Kappe wird vulnerabel (Libby P, 2000). Zentrale Bedeutung bei der Plaquedestabilisierung wird heute vor allem den Matrixmetalloproteinasen wie Kollagenasen, Elastasen und Stromelysinen im Schulterbereich des Plaque beigemessen (Galis et al., 1994). Die Schulterregion gilt als besonders instabilitätsgefährdet, da an diesen Stellen zum einen verstärkt

Entzündungszellen in den Plaque eindringen und akkumulieren können und andererseits diese Stellen der Blutströmung verstärkt ausgesetzt sind.

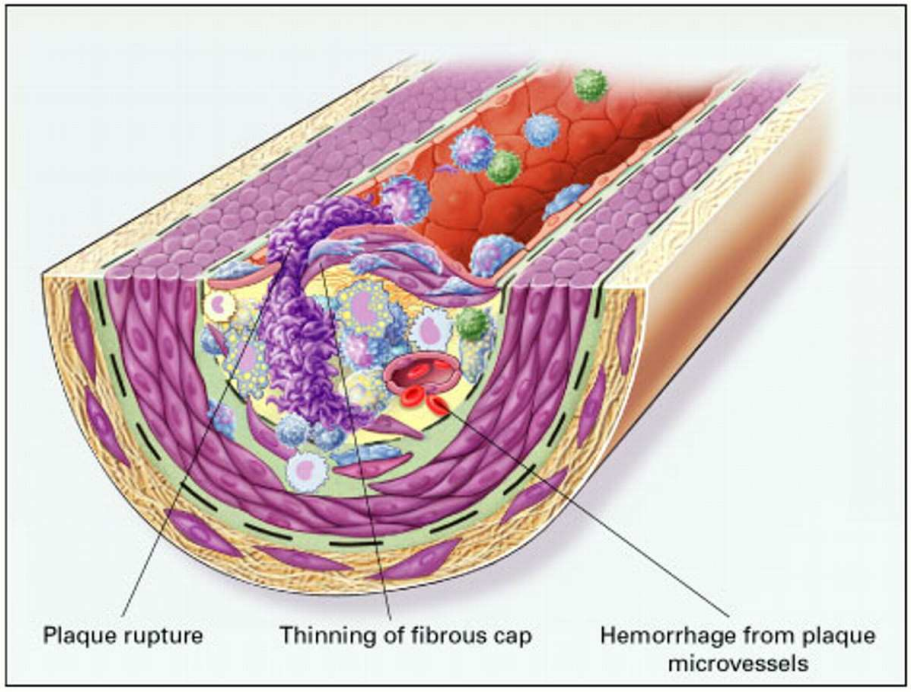


Abb. 4.: Schema eines instabilen Plaques (modifiziert nach Ross, 1999)

2.1.5 Angina pectoris als Manifestation der koronaren Herzerkrankung

2.1.5.1 Stabile Angina pectoris

Leitsymptom der Koronarinsuffizienz ist die Angina pectoris (AP), die sich in der Regel bei kritischer Koronarstenose (>75%) manifestiert. Es kommt zu vorwiegend retrosternal lokalisierten Schmerzen, einem Druckgefühl, einem Brennen oder Engegefühl, die oft zum Hals, Unterkiefer, die Schultergegend, den linken oder seltener rechten Arm bis in die ulnaren Fingerspitzen oder den Oberbauch ausstrahlen. Ausgelöst werden können diese Symptome durch Exposition zu kalter Außentemperatur, körperlicher oder psychischer Belastung.
Die stabile Angina pectoris ist regelmäßig durch bestimmte Mechanismen auslösbar, hat eine Dauer von mehr als 2 und weniger als 10 Minuten und spricht gut auf sublingual verabreichtes Nitroglycerin an (Harrison`s; Principles of Internal Medicine, 16th Edition).

2.1.5.2 Instabile Angina pectoris

Die instabile AP wird zum akuten Koronarsyndrom gezählt, zu dem ausserdem der NSTEMI (non ST-segment-elevation myocardial infarction) und der STEMI (ST-segment-elevation myocardial infarction) als Formen des akuten Myokardinfarktes zählen. Patienten mit diesen akuten ischämischen Syndromen beklagen gewöhnlich Symptome, die in der Qualität ähnlich denen der stabilen AP sind, jedoch intensiver und prolongierter verlaufen. Die Symptome beginnen in Ruhe oder während des Schlafes, dauern ca. 10-20 Minuten an und werden durch sublingual verabreichtes Nitroglycerin nicht oder nur vorübergehend gebessert. Die instabile AP kann entweder primär auftreten oder sekundär aus einer bislang stabilen AP hervorgehen. Es sollte stets die Bestimmung von frühen Herzenzymen, wie Troponin T, erfolgen, da ein akutes Infarktrisiko herrscht (Harrison`s; Principles of Internal Medicine, 16th Edition).

2.2 Atherosklerose als Entzündungskrankheit

Die Neudefinition der Atherosklerose als chronisch inflammatorische Erkrankung (Ross 1999, Glass und Witztum 2001) führte zu umfassenden Untersuchungen bezüglich des Ansprechens auf antientzündliche Therapien und prognostischer Bedeutung verschiedener Entzündungsparameter. Besondere Bedeutung für die Prognoseabschätzung wird vor allem dem C-reaktiven Protein (CRP) beigemessen. Leicht erhöhte CRP-Werte gelten als Indikator einer atherosklerotischen Inflammation (Haverkate F et al., 1997), wobei durch aktuellere Studien betont wird, dass der CRP-Anstieg einer klinisch symptomatischen Atherosklerose oft um Jahre vorausgeht (Liuzzo G, 1994; Ridker PM et al., 1997). Die Höhe der CRP-Werte bei gesunden Personen lässt also eine prognostische Aussage bezüglich des späteren Erkrankungsrisikos an akutem Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu (Ridker et al., 1997; Horowitz et al, 2000). Steady state- CRP Konzentrationen sind bei Patienten mit stabiler Angina pectoris annähernd zweimal höher als bei kardiovaskulär Gesunden (D.J. Brull, 2003). CRP ist jedoch nicht nur ein Marker für ablaufende vaskuläre Entzündungsvorgänge, sondern kann in Synergie mit Lipopolysacchariden durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen auch direkten Einfluss auf Atherogenese und Plaquestabilität nehmen (Pasceri et al., 2001; Torzewski et al., 2000; Zwaka et al., 2001). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass CRP unterstützend bei der Induktion der tissue factor (TF)-Produktion durch Monozyten mitwirkt, im Plaque oxidiertes LDL-Cholesterol bindet (de Beer FC, 1982) und das Komplementsystem aktiviert (Torzewski J, 1998). Diese Beobachtungen suggerieren dass CRP möglicherweise eine integrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt (D.J. Brull, 2003).

2.3 C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein gehört zu der phylogenetisch alten Proteinfamilie der Pentraxine**,** zu der auch das Serum-Amyloid A gehört (Osmand A.P., 1977). Beim Menschen und manchen Tierspezies stellt das CRP ein Hauptprotein der Akute-Phase-Proteine dar, dessen Serumkonzentration schnell und ausgeprägt infolge von Infektion, Inflammation oder Gewebsverletzung ansteigt (Volanakis, 2001).

Beeindruckende biologische Charakteristika sind sowohl der schnelle Anstieg seiner Serumkonzentration während der akuten Phase, welcher seinen Höhepunkt innerhalb 24-48 Stunden erreicht und mit einem bis zu 1000-fachen Anstieg einhergehen kann, als auch der rasche Rückgang auf die sehr niedrige normale Konzentration von nur einigen Mikrogramm pro Milliliter (Volanakis, 2001).

2.3.1 Regulation der CRP-Expression

Die Expression des Proteins wird hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert, posttranskriptionelle Mechanismen spielen jedoch auch eine signifikante Rolle. Das CRP-Gen wurde auf dem menschlichen Chromosom 1 entschlüsselt, zwischen 1q21 und 1q23 liegend, es beinhaltet 2263 Nukleotide und ein einziges Intron (Woo et al., 1985). Das Transkriptionsprodukt ist charakterisiert durch eine 1,2 bp (Basenpaare) lange untranslatierte Region, welche möglicherweise seine prompte Degradation nach der Wiederherstellung von Gewebsstruktur und –funktion vermittelt. Verantwortlich für seine Serumkonzentration ist die CRP-Synthese der Leber (Gabay und Kushner, 1999), extrahepatische Exprimierung wurde jedoch auch dokumentiert (Dong und Wright, 1996). Der zentrale Induktor der CRP-Translation ist das Interleukin-6 (IL-6), welches in Synergie mit Induktoren wie IL-1, Glucocortikoiden und komplementaktivierenden Produkten wirkt (Toniatti et al., 1990a; Szalai et al., 2000a).
Die posttranskriptionelle Regulation betreffend konnte insbesondere gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit und Rate der Sekretion von intrazellulär gebundenem CRP während der akuten Phase signifikant gesteigert wird (Macintyre SS et al., 1985). Diese beschleunigte Sekretion geht einher mit einer Konformationsänderung, welche die Affinität des CRP für seine Esterasen herabsetzt und folglich zu einem verzögerten Abbau führt (Yue et. al., 1996).

2.3.2 Struktur des CRP

Wie das Serumamyloid P, welches das zweite Pentraxin bekannter Struktur darstellt (Emsley et al., 1994), ist CRP ein zyklisches Pentamer, das aus fünf nicht kovalent

gebundenen identischen 23,5 kD großen Protomeren aufgebaut ist (Volanakis, 2001). Ein Protomer besteht aus 206 Aminosäuren (Lei et al., 1985; Mullenix und Mortensen 1994), die in zwei antiparallel verlaufende β-Stränge gefaltet sind und so eine abgeflachte jellyroll-Topologie einnehmen. Die sich anschließende lange α-Helix faltet sich in enge Topologie zu einem der β-Stränge. Das Carboxy-terminale Ende der α-Helix formt eines der beiden Seiten einer ungewöhnlichen Verbindung zwischen der Gegend des Protomerzentrums und dem zentralen Punkt des Pentamers (Volanakis, 2001). Die andere Seite der Verbindung wird gebildet aus den Amino- und Carboxyl-Termini des Protomers. Die C1q-Bindungsdomäne (Agrawal et al., 2001b) und möglicherweise auch die FcR-Bindungsdomäne (Marnell et al., 1995) sind mit dieser Verbindung assoziiert. Auf der Gegenseite des Protomers befinden sich zwei Ca-Ionen ligiert an die Seiten- und Hauptketten-Carbonyle der Polypeptidkette und sind beide beteiligt an der Ligandenbindung. Elektronenmikroskopische Daten weisen darauf hin dass alle Protomere des CRP-Pentamers die gleiche räumliche Orientierung aufweisen (Roux et al., 1983), so dass das Molekül eine „Erkennungsseite“ mit seinen fünf Phosphocholin (PCh)-Bindungsdomänen und eine „Effektorseite“ bestehend aus der C1q- und vermutlich der FcR-Bindungsdomäne, aufweist (Volanakis, 2001).

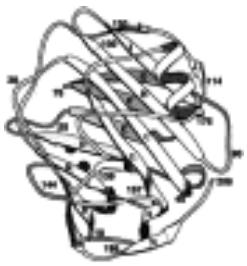


Abb. 5: Protomer des CRP-Moleküls (Volanakis, 2001)

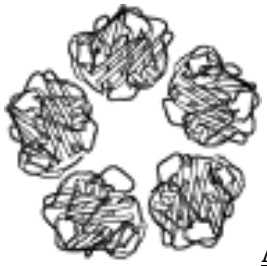


Abb. 6: CRP-Molekül: Zyklisches Pentamer (Volanakis, 2001)

2.3.3 Funktion des CRP

Die biologische Hauptfunktion des CRP ist determiniert durch seine Fähigkeit, Pathogene und beschädigte Zellstrukturen des Wirtsorganismus zu erkennen und diese durch Rekrutierung des Komplementsystems und phagozytierender Zellen zu eliminieren. Phosphocholin (PCh), der Haupligand des CRP, befindet sich in zahlreichen kapsulären Kohlenhydraten und Lipopolysacchariden von Bakterien und anderen Mikroorganismen. Das Vorkommen von PCh wurde bereits beschrieben in S. pneumoniae (Brundish und Baddiley, 1968), Haemophilus influenzae (Weiser et al., 1997), Pseudomonas aeruginosa, Neisseria meningitidis und gonorrhoeae (Serino und Virji, 2000), Proteus morganii und Aspergillus fumigatus (Longbottom und Pepys, 1971). PCh ist weiterhin vorhanden in der äußeren Schicht der meisten biologischen Membranen wie auf Lecithinen und Sphingomyelinen. Zellschaden verursacht einen Austausch von Phospholipiden (flip-flop) zwischen der Innen- und Außenschicht von Membranen. In Folge kommt es zur Anreicherung von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin in der Aussenschicht und zu vermehrter Hydrolyse von Phospholipiden durch Phospholipase A2. Dadurch fällt verstärkt Lysolecithin innerhalb der äußeren Membranschicht an und CRP kann an seinen Liganden auf der Zelloberfläche binden (Hack et al., 1997). Zum membranären flip-flop kommt es ausserdem auf apoptotischen Zellen, die auf gleiche Weise ebenfalls Angriffsziel für Phospholipase A2 und CRP werden (Gershov et al., 2000). CRP bindet weiterhin an durch Komplemenangriff sublytische Zellen und an nekrotische Zellen (Du Clos et al., 1988; Pepys et al., 1994).

An einen multivalenten Liganden gebundenes CRP wird durch C1q erkannt und kann im Folgenden durch die Formation einer C3-Konvertase den klassischen Weg des Komplementsystems effizient aktivieren (Kaplan und Volanakis, 1974; Siegel et al., 1975). Die Komplementaktivierung initiiert eine Anlagerung opsonierender Faktoren von C3 und C4 an die Oberfläche des Liganden und führt schließlich zu dessen Phagozytose, was durch eine Fülle in vivo- und in vitro-experimenteller Daten belegt ist (Volanakis, 2001). Allerdings bleibt die Fähigkeit der Komplementaktivierung auf die Bildung der C3-Konvertase beschränkt (Berman et al., 1986), welche nur die opsonierende Funktion mediiert. Proinflammatorische und membranschädigende Effekte des Komplements können nur via alternativem Weg

über C5 aktiviert werden, was durch an CRP bindenden Faktor H inhibiert wird (Mold et al., 1984, 1999).

Die opsonierenden Eigenschaften des CRP wurden sowohl für Makrophagen (Mortensen und Duszkiewicz, 1977) als auch für Neutrophile (Kilpatrick und Volanakis, 1985) gezeigt. Neben seinen komplementaktivierenden Eigenschaften gibt es Hinweise darauf, dass CRP einen zusätzlichen direkten Effekt hinsichtlich der Bakterienbekämpfung aufweist (Szalai et al., 1996), indem es synergistisch mit C3b/iC3b phagozytose-unterstützend wirkt. Obwohl das gesamte Spektrum der von CRP geleisteten bakteriellen Protektion nicht umfassend definiert ist, ist seine unterstützende Rolle bei der komplementvermittelten Phagozytose apoptotischer Zellen bekannt (Gershov et al., 2000).

Die Interaktion von CRP mit Monozyten und Makrophagen induziert ausserdem tumorizide Aktivität, die Produktion von Wasserstoffperoxid (Tebo und Mortensen, 1991) und die Sekretion von Interleukin-1 und TNF (Galve-de Rochemonteix et al., 1993).

Im Gegensatz zu beschriebenen Effekten kommt es CRP-mediiert auch zu einer down-Regulation von Neutrophilen (Buchta et al., 1988) und deren chemotaktischen Antworten (Heuertz et al., 1999), was insgesamt zu einer abgeschwächten Aktivität der Neutrophilen während der akuten Inflammation führt.

Durch seine Funktion als sensibler Marker der Inflammation, einem Prozess der in der Pathogenese atherosklerotischer Läsionen von Bedeutung ist, ist CRP in den letzten Jahren zu einem zentralen Prognosemarker für atherosklerotische Komplikationen geworden. Diese Funktion stellt einen scharfen Kontrast zu seiner im Allgemeinen protektiven und antiinflammatorischen Wirkung dar und bedarf damit näherer Untersuchung (Volanakis, 2001).

2.4 CRP-Gen

2.4.1 Struktur

Das CRP-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 1q23[29.] Es besteht aus zwei Exons und einem dazwischenliegenden Intron, das einen polymorphistischen $(GT)^n$-Repeat enthält (Lei K-J et al., 1985; Woo P et al., 1985).
Nach einem Exon, das für ein Signalpeptid bestehend aus 18 Aminosäuren (AS) kodiert, folgt das Intron. Dieses ist aus 278 Basenparen (bp) aufgebaut und geht über in eine Nukleotidsequenz für die verbleibenden 204 AS (Lei KJ et al., 1985). Das Intron besitzt einen ungewöhnlichen Aufbau, da sich an seinem positiven Ende eine poly(A) Region aus 16 Nukleotiden und eine poly(GT) Region aus 30 Nukleotiden befindet, welche die Z-Form der DNA annehmen können. Die mRNA-Cap-Region ist 104 Nukleotide vom Start entfernt lokalisiert. Das Gen besitzt einen typischen Promotor, welcher die Sequenzen TATAAAT und CAAT 29 und 81 bp aufwärts der cap site beinhaltet (Lei KJ et al. 1985).

2.4.2 Polymorphismen des CRP-Gens

2.4.2.1 Einfluss auf den Plasma-CRP-Spiegel

Die Vermutung, es existierten genetische Polymorphismen, die direkt und vorhersehbar den steady-state Serum-CRP-Spiegel beeinflussen, hat großes Interesse in der Grundlagenforschung geweckt. Durch die interindividuelle Variabilität der baseline-CRP-Spiegel wird der klinische Nutzen des Serum-CRPs als Prediktor des kardiovaskulären Risikos limitiert (Person TA et al., 2003). Es bleibt demnach ungewiss ob leichte Elevationen des Basis-CRP-Spiegels auf eine schwelende Entzündung oder eine zugrunde liegende genetische Prädisposition für höhere CRP-Spiegel und somit höheres Risiko hinweisen (Szalai AJ et al., 2005). Schon 2003 zeigten Zee und Ridker dass ein 1059 G/C- Polymorphismus in Exon1 des CRP-Gens mit Unterschieden des Basis-CRP-Spiegels assoziiert ist. Szalai et al. konnten 2002 beweisen, dass die Variationen des baseline-CRP zwischen Individuen mit einem Dinukleotid-Repeat innerhalb des CRP-Introns vergesellschaftet sind. Es

handelt sich dabei um einen GT-Repeat innerhalb des Introns, wobei beobachtet wurde, dass bei Individuen mit heterozygoten GT^{16}, GT^{21} oder $GT^{16/21}$ Allelen ein zweifach niedrigeres Basis-Serum-CRP ermittelt wurde als bei Personen mit anderen Genotypen (Szalai AJ et al., 2002).
Weiterhin fanden Brull et al. 2003 einen 1444C/T Polymorphismus in der 3`untranslatierten Region (UTR), der mit baseline- und stimulierten CRP-Spiegeln assoziiert ist. Jedoch sind keine dieser berichteten Assoziationen zurückzuführen auf einen funktionellen Polymorphismus innerhalb des CRP-Gens (Szalai et al., 2005), keine dieser Arbeiten zeigt funktionelle Unterschiede zwischen den Allelen (Carlson CS et al., 2005).

2.4.2.2 Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

Innerhalb des CRP-Gens sind bislang dreizehn „Single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) in der kaukasischen Bevölkerung bekannt (Carlson CS et al., 2005) und neun davon werden mit dem Serum-CRP-Spiegel in Verbindung gebracht. Viele der SNPs weisen eine Korrelation auf, vor allem SNP rs3116653 und rs1417938 haben eine starke Beziehung zueinander.
Zahlreiche SNPs besitzen weiterhin eine Korrelation mit CRP-Serumspiegeln, so konnte eine hochsignifikante Assoziation zwischen SNP -757 (rs3093059) und SNP -286 (rs3091244) sowie eine grenzwertige zwischen SNP -7180 (rs1341665) und Serum-CRP-Spiegeln gefunden werden (Wang Q et al., 2006). Höchste Spiegel zeigen Individuen mit SNP 790 (rs3093058), niedrige Werte Personen mit SNP 1440 (rs3091244) (Carlson S et al., 2005). Zusätzlich wurde auch die Kombination unterschiedlicher SNPs und deren Einfluss auf baseline-CRP betrachtet. Demnach ist bekannt, dass bei kombinierter Betrachtung des biallelischen SNP 409 (G-A) rs3093062 und des triallelischen SNP 390 (C-T-A) rs3091244 Individuen mit dem Haplotyp (-409G/-390T) die höchsten Basis-Serum-CRP-Spiegel aufweisen (10,9+/-2,25 µg/ml) und solche mit dem Haplotyp (-409A/-390T) die niedrigsten (5,01+/-1,56µg/ml) (Szalai AJ et al., 2005). Auch SNP 1919T (rs1417938) und SNP 790T (rs3093058) sind mit elevierten, jedoch SNP 3872A-Allel (rs1205) mit niedrigeren CRP-Spiegeln vergesellschaftet (Lange LA et al., 2006).

2.4.2.3 Triallelischer SNP rs3091244

Besonders der im E-Box Element der Promotor Region (Szalai AJ et al., 2005) lokalisierte triallelische SNP (C-T-A) rs3091244 soll für 1,4% der gesamten Serum-CRP-Variation verantwortlich sein (Kathiresan S et al., 2006). Weiterhin korreliert er stark mit Haplotypen, die sich aus den zwei anderen SNPs rs1205 und rs2808630 zusammensetzen und auch separat mit hohen CRP-Spiegeln assoziiert sind. Homozygote Träger der Hauptallele (CC Genotyp) weisen den niedrigsten, heterozygote Träger der Hauptallele einen intermediären und homozygote Träger der Nebenallele T oder A den höchsten Serum-CRP-Spiegel auf. Obwohl der triallelische SNP stark mit dem Serum-CRP-Level und dieser mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) korreliert ist, kann keine Assoziation zwischen dem SNP rs3091244 Genotyp und einer prävalenten CVD nachgewiesen werden (Kathiresan S et al., 2006). Jedoch wird in unserer Studie analysiert ob ein Zusammenhang zwischen diesem Genotyp und dem Auftreten von instabiler Angina pectoris als Erstmanifestation einer KHK besteht.

2.4.3 CRP-Genotyp und Ethnizität

Weitere Beobachtungen zeigen, dass das mit dem CRP-Genotyp assoziierte Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung innerhalb verschiedener Ethnizitäten unterschiedlich ausgeprägt ist. So kommt es bei kaukasischen Individuen mit den Allelen 2667C (rs1800947) und 3872A (rs1205) durch niedrigere CRP-Spiegel zu einem reduzierten kardiovaskulären Risiko, jedoch bei dem Allel 1919T (rs1417938) zu einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität im Vergleich zur homozygoten 1919A-Ausprägung. Im Gegensatz dazu geht bei afroamerikanischen Studienteilnehmern eine 790TT-Homozygotie mit einem bis zu vierfach erhöhten Risiko für einen akuten Myokardinfarkt einher (Lange LA et al., 2006).
Für Repräsentanten der chinesischen Bevölkerung mit dem SNP 717A-Allel (rs2794521) wird sogar ein 6,8fach erhöhtes Risiko angegeben, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden (Chen J et al., 2005).
Afroamerikanische und spanische Studienteilnehmer mit stattgehabten kardiovaskulären Ereignissen weisen eine höhere Frequenz an GT^{20}-Repeats

innerhalb des Introns auf als solche ohne kardiovaskuläre Vorbelastung. Schließlich ist die Allelfrequenz von GT^{16} und GT^{21} innerhalb der kaukasischen Bevölkerung zweifach höher als unter Afroamerikanern (Szalai AJ et al., 2005).

2.5 CRP-Rezeptoren: Fcγ-Polymorphismus

2.5.1 Struktur

Humane Immunglobulin G-Rezeptoren (FcγR) schaffen eine wichtige Verbindung zwischen den humoralen und zellulären Teilgebieten des Immunsystems. Sie induzieren eine Fülle biologischer Effektorfunktionen wie Phagozytose, Endozytose, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), Zytokinproduktion und –freisetzung, Antigenpräsentation und die Beseitigung von Immunkomplexen (van de Winkel et al., 1993 und 1996).

Fcγ-Rezeptoren gehören zur Immunglobulin (Ig) Superfamilie und werden beim Menschen in drei Klassen aufgeteilt: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16), die jeweils verschiedene Isoformen aufweisen (van Sorge NM et al., 2003). Fcγ-Klassen beinhalten strukturell und biochemisch differente Moleküle und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zellverteilung sowie ihrer Affinität und Spezifität für IgG-Subklassen, ihrer Fähigkeit intrazelluläre Signale zu triggern sowie ihrer Molekulargewichte. Zusätzlich zur interindividuellen Heterogenität der FcγR bietet ein genetischer Polymorphismus weitere Variation zwischen Individuen.

Die leukozytären Fcγ-Rezeptoren sind auf acht Genen des langen Arms von Chromosom 1 codiert (van der Pol WL, 1998). Die genomische Organisation des FcγRII-FcγRIII-Locus wurde erst kürzlich identifiziert (Su K, 2003). Die Diversität wird als Ergebnis evolutionärer Gen-Duplikationen und Rekombinationen angesehen, die gefolgt wurden von gain-of-function Mutationen (Gavin AL, 1998).

FcγR liegen als hetero-oligomere Komplexe vor und gehören somit zu der Familie der „Multichain immune recognition receptors, MIRR“. Die Liganden-bindende α-Kette der meisten FcγR besteht aus zwei oder drei extrazellulären immunglobulinähnlichen Domänen, einer transmembranären und einer intrazellulären Region. Sie kann mit mehreren Signalkomponenten, den Fc γ-, β-

oder ζ- Ketten assoziiert sein. Fcγ- und ζ-Ketten formen Disulfid-gebundene Homo- oder Heterodimere (γ-γ, ζ-ζ, γ-ζ) (Rascu et al.). Die drei FcγR-Signalketten sowie die α-Kette von FcγRIIa tragen einzigartige „immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM“ in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Die Phosphorylierung von Tyrosin in ITAM führt über noch nicht vollständig bekannte Mechanismen zur Zellaktivierung. FcγRIIb beinhalten im Gegensatz dazu „immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motifs, ITIM“, welche in der down-Regulation zellulärer Funktionen beteiligt sind (van de Winkel et al., 1996).
In allen FcγR-Klassen sind auch lösliche Formen bekannt, die durch alternatives mRNA-Splicing im Fall von sFcγRIIa2 (Warmerdam et al., 1990; Rappaport et al., 1993), durch proteolytische Spaltung membrangebundener FcγR im Fall von sFcγRIIIa und –IIIb (Lanier et al., 1989; Levy et al., 1991) sowie durch Translation von Stopcodons im Fall von sFcγRIb und –Ic (Ernst et al., 1992) generiert wurden. Obwohl die biologische Funktion löslicher FcγR noch nicht eindeutig erschlossen ist, sind verschiedene immunmodulatorische Effekte wie die Inhibierung der Ig-Produktion durch B-Zellen experimentell belegt worden (Sautes et al., 1990).
Die Expression der Rezeptoren ist reguliert durch Zytokin- sowie Wachstumsfaktorwirkung.

2.5.1.1 FcγRI (CD64):

Es sind drei FcγRI-Gene identifiziert (FcγRIA, -IB, IC), die vier verschiedene Transkriptionsprodukte generieren (Ernst LK, 1992). FcγIa ist der einzige humane Rezeptor der eine hohe Affinität für monomeres IgG aufweist. FcγRIB und FcγRIC verschlüsseln vermutlich lösliche, nicht oberflächengebundene Rezeptoren aufgrund vorhandener Stopcodons in der extrazellulären Region (van Sorge et al., 2003). Sie werden auf myeloiden Zellen und Neutrophilen exprimiert.

2.5.1.2 FcγRII (CD32):

Drei Gene (FcγRIIA, -IIB, IIC) generieren sechs mRNA-Transkriptionsprodukte. FcγRII besitzt eine geringe Affinität für monomeres IgG, jedoch ein effizientes Bindungsvermögen für IgG-Immunkomplexe.

FcγRIIa stellt den weitverbreitesten Rezeptor dar und kommt auf allen myeloiden Zellen, Thrombozyten, einigen T-Zellen und Endothelzellen vor. Diese Tatsache ist für die Kardiologie besonders interessant, da sowohl Thrombozyten als auch Endothelzellen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie und in der Therapie des akuten Koronarsyndroms spielen.
Die Expression von FcγRIIb ist auf B-Zellen, Monozyten und Makrophagen beschränkt (Tridandapani S, 2002), die von FcγRIIc auf natürliche Killerzellen.

2.5.1.3 FcγRIII (CD16):

Es sind zwei Gene und zwei Transkriptionsprodukte entschlüsselt (FcγRIIIA, -IIIB). Beide Klasse III-Rezeptoren binden bereitwillig IgG-Immunkomplexe, FcγRIIIa besitzt ausserdem intermediäre Affinität für monomeres IgG (van Vugt MJ, 1999; Wu J, 1997).
FcγRIIIa wird exprimiert auf Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und manchen T-Zellen, FcγRIIIb konstitutiv auf Neutrophilen und IFNγ-induziert auch auf Eosinophilen (van Sorge et al., 2003).

2.5.2 Funktion

Die FcγR-Fuktion wird bestimmt durch strukturelle Unterschiede sowie durch charakteristische Kombinationen von Rezeptor-Allotypen. Die aktivierenden FcγRIIa, -IIIa und –IIIb besitzen jeweils zwei Allel-Varianten, die ihre Rezeptorfunktionen beeinflussen (van Sorge et al., 2003).
FcγRI unterstützt die Antigen-Präsentation an T-Zellen, wodurch 100-fach weniger Antigen benötigt wird als bei nicht FcγRI-mediierter Antigen-Präsentation. Dabei erleichtert es sowohl MHC-Klasse 1 auch auch Klasse 2-beschränkte Antigen-Präsentation und kann so einen potenten Impfeffekt induzieren (van der Pol WL et al., 1998).
FcγRIIa kann die Antigen-Präsentation weniger effizient unterstützen (Fanger NA et al., 1996 und 1997), jedoch andere Effekte wie Phagozytose und Degranulation wirksam induzieren. FcγRII repräsentiert die einzige auf Thrombozyten exprimierte Rezeptorklasse und triggert so die Thrombozytenaggregation und –degranulation,

weswegen sie auch in der Pathogenese der Thrombozythämie und thrombotischer Kompliktionen impliziert ist. FcγRIIa ist einzigartig in seiner Fähigkeit der Interaktion mit IgG2. Da IgG2 die wichtigste gegen bakterielle Polysaccharide gerichtete Antikörpersubklasse darstellt, erlangt FcγRIIa zentrale Bedeutung in der Bekämpfung bekapselter Bakterien (van der Pol WL et al., 1998).

FcγRIIb wird in B-Zellen und nach neuesten Erkenntnissen auch in Makrophagen und Monozyten exprimiert (Tridandapani et al., 2002). Dieser Rezeptor ist dazu fähig, ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)-mediierte Effekte zu inhibieren. So führt die Doppelbindung von B-Zell-Rezeptor (ITAM beinhaltend) und FcγRIIb durch Immunkomplexe zu einer Down-Regulation der Antikörperaktivität in vivo und in vitro. (van Sorge et al., 2003). FcγRIIb übt inhibitorische Effekte auf Monozyten-/Makrophagen Effektorfunktionen aus und spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation von ITAM-FcγR-induzierten inflammatorischen Antworten. Diese Down-Regulation humaner proinflammatorischer Antworten kann abgesehen von FcγRIIb auch über lösliche FcγR (sFcγR) transportiert werden (Gavin AL et al., 1995). SFcγR können um IgG-Immunkomplexe konkurrieren und auf diese Weise mit der Induktion FcγR-mediierter Funktionen interferrieren.

FcγRIIc und –IIIa werden auf NK-Zellen exprimiert. Aufgrund eines Polymorphismus ist die Expression von FcγRIIc abhängig von einer interindividuellen Variation des FcγRIIC-Gens (Metes D et al., 1998). Die Triggerung von FcγRIIIa auf NK-Zellen verursacht die Produktion von Lymphokinen und antikörperabhängiger zellulärer Zytotoxizität (ADCC), woraus eine Rolle dieses Rezeptors bei der Abwehr des Wirtsorganismus gegen virale Infektionen und Malignome geschlossen werden kann. Auf Makrophagen wird dem FcγRIIIa eine wichtige Rolle bei der Beseitigung zirkulierender Immunkomplexe zugeschrieben (Clarkson SB et al., 1986). Die funktionelle Vernetzung von FcγRIIa und FcγRIIIb scheint synergistische Antworten zu triggern (van der Pol WL et al., 1998). FcγRIIa wird dabei als essentiell für die Induktion effizienter Effektorfunktionen angesehen, wohingegen der Überfluss an FcγRIIIb eine wirksame Interaktion mit IgG-Komplexen garantiert.

Zusätzlich zu den leukozytären FcγR wird auf Endothelien, einigen mukosalen Epithelien und pläzentären Trophoblasten eine strukturell unterschiedliche IgG-Rezeptorklasse, die neonatale FcR (FcRn) exprimiert. FcRn besteht aus einer α-

Kette, die strukturell mit den MHC Klasse I-Molekülen verwandt ist und durch β2-Mikroglobulin vervollständigt wird (Simister NE et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass FcRn IgG vor dem Abbau durch endotheliale Pinozytose schützt (Junghans RP et al., 1996) und es durch polarisierte Epithelien wie die Plazenta (Story CM et al., 1994) und die Mukosa (Spiekermann GM et al., 2002) transportieren kann. Dabei bindet es IgG in saurem pH und gibt es in neutralem frei. β2-Mikroglobulin ist das essentielle Glied für die Expression und Funktion des FcRn, die α-Kette allein wird im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und ist somit weniger wirksam in der Interaktion mit IgG (Ghetie V et al., 2000).

2.5.3 FcγR-Polymorphismen

Drei FcγR-Subklassen weisen funktionell relevante genetisch determinierte Polymorphismen auf. Die aktivierenden FcγRIIa, -IIIa und –IIIb besitzen jeweils zwei die Rezeptorfunktionen beeinflussende Allel-Varianten.

2.5.3.1 FcγRIa

FcγRIa ist nicht polymorphistisch. Es wurde jedoch eine einzige Familie in Belgien entdeckt, die aufgrund einer Nukleotiddifferenz (van de Winkel et al., 1995) ohne phagozytäre Expression von FcγRIa lebt (Ceuppens et al., 1988). Interessanterweise waren alle Familienmitglieder gesund und wiesen keinerlei autoimmune, infektiöse oder inflammatorische Fehlsteuerung auf.

2.5.3.2 FcγRIIa

FcγRIIa besitzt in seiner die Ligandenbindungsdomäne kodierenden Region eine G zu A-Punktmutation, die eine Arginin (R) zu Histidin (H) Aminosäurensubstitution an Position 131 verursacht. Dies führt zu unterschiedlicher Rezeptoraffinität und -spezifität. Die FcγRIIa Allele zeigen ausgeprägte Variabilität hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens von IgG2 und IgG1, insbesondere aber von CRP (Stein MP et al., 2000). Beim Vorliegen homozygoter FcγRIIa H131 Allele kommt es zu höherer Affinität für humanes IgG2 und IgG3 (Parren PW et al., 1992), CRP zeigt ein

vermindertes und bei Heterozygotie ein intermediäres Bindungsverhalten. Bei homozygoten FcγRIIa R131 Allelen bindet CRP jedoch mit hoher Avidität an Monozyten und PMN. Von besonderer Bedeutung ist, dass FcγRIIa-H131 der einzige Rezeptor mit effizienter Interaktionsfähigkeit mit humanem IgG2 ist (Lehrnbecher T et al., 1999).

2.5.3.3 FcγRIIIa

Das FcγRIIIa-Gen weist eine T zu G-Substitution bei Nukleotid 559 auf, die einen Austausch von Valin (V) durch Phenylalanin (F) an Aminosäurenposition 158 zur Folge hat. IgG-induzierte NK-Zellaktivität ist bei FcγRIIIa-V/V158 aufweisenden Individuen höher als bei FcγRIIIaF/F158 besitzenden Personen, da erstgenannter Polymorphismus eine höhere Affinität für hIgG1, hIgG3 und hIgG4 hat (Koene HR et al., 1997).

2.5.3.4. FcγRIIIb

FcγRIIIb beinhaltet den Neutrophilen-Antigen Polymorphismus in seiner membranfernen Ig-ähnlichen Domäne. Eine Substitution von vier Aminosäuren verursacht allelische Unterschiede bezüglich der Rezeptorglykosylierung (Huizinga TW et al., 1990). FcγRIIIb-NA1 induziert die Phagozytose IgG1- und IgG3 – opsonierter Partikel und bindet immungebundenes IgG3 effizienter als der FcγRIIIa-NA2 Allotyp (Salmon JE et al., 1995).

Zusätzlich wurden einige nichtfunktionelle Polymorphismen oder solche unbekannter funktioneller Konsequenz beschrieben (Warmerdam PA et al., 1990; Ernst LK et al., 2002).

2.5.4 Klinische Relevanz der FcγR-Polymorphismen

Die klinische Bedeutung der genetisch determinierten interindividuellen Variabilität der FcγR Funktion wurde bereits eingehend untersucht, wobei meistens Fall-Kontroll Studien benutzt wurden. Es existieren nun zwei generelle Konzepte, in

denen FcγR-Polymorphismen entweder zu einer Prädisposition für Krankheiten führen oder den Krankheitsverlauf modifizieren (van Sorge et al., 2003).

Die Effizienz der FcγR-IgG-Interaktion kann die Ergiebigkeit der Immunkomplex-Beseitigung vorhersagen (Dijstelbloem HM et al., 2000). Eine verhältnismäßig unwirksame Immunkomplex-Abräumung erniedrigt die Schwelle der Immunkomplex-Ablagerung in peripheren Geweben mit anschließender Inflammationsinduktion und kann die Eindämmung bakterieller Infektionen behindern (van Sorge et al., 2003). Dieses Konzept kann enorm wichtig werden, wenn IgG2 die dominante Subklasse darstellt, da eine effiziente FcγR-Interaktion besonders vom FcγRIIa Genotyp abhängt. IgG2 ist die wichtigste Subklasse für die Abwehr bekapselter, humanpathogener Bakterien einschließlich Keimen wie Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae und Streptococcus pneumoniae. Es konnte eine klare Korrelation zwischen niedrigen Mengen oder nicht vorhandenen IgG2 und dem rezidivierenden Auftreten von Infektionen des Respirationstraks und Infektionen durch bekapselte Bakterien (Jefferis et al., 1990) gefunden werden. FcγRIIa-H/H131 homozygote Neutrophile weisen eine wesentlich bessere Phagozytosefähigkeit von durch IgG2 opsonierten Bakterien auf als –IIa-R/R131 homozygote Zellen (Sanders et al., 1995). Weiterhin wurde suggeriert, dass dem FcγRIIa-Polymorphismus noch stärkere Relevanz beigemessen werden müsse bei relativ niedrigen IgG2-Mengen, wie bei Kindern (Sanders et al., 1994).

Gegen C1q gerichtete Autoantikörper wie beim systemischen Lupus erythematosus, sowie gegen Phospholipide gerichtete Autoantikörper wie beim Antiphospholipidsyndrom, sind hauptsächlich Vertreter der IgG2-Subklasse.

Es konnte eine klinisch relevante Assoziation zwischen SLE und dem FcγRIIa-R/R131-Genotyp gefunden werden, welcher als ererbter Risikofaktor für diese Erkrankung beschrieben wurde. Patienten mit homozygotem R/R131 zeigten eine signifikant höhere Frequenz von Proteinurie, hämolytischer Anämie sowie antinuklärer Antikörper. Bei Krankheitsbeginn waren die Patienten jünger und es kam früher zu spezifischen Komplikationen als bei Patienten mit fehlendem R/R131-Genotyp (Manger et al., 2002). Entsprechende Korrelationen wurden auch für die Rheumatoide Arthritis (Morgan AW et al., 2000), die Wegener Granulomatose (Dijstelbloem HM et al., 1999), die Myasthenia gravis (Raknes G et al., 1998) und auch die Multiple Sklerose (Myhr KM et al., 1999) beschrieben. Die FcγR-IgG-Interaktion kann auch relevant sein für die Autoantikörper-Interaktion mit

FcγRIIa auf Thrombozyten wie bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie. Brandt et al. bestätigten, dass die Frequenz des FcγRIIa-H/H131 Allotyps bei Patienten mit HIT signifikant höher war als bei gesunden Kontrollpersonen.
Es sollte beachtet werden, dass Resultate von Assoziationsstudien oft wiedersprüchlich sind. Dies ist womöglich auf Unterschiede in Einschlusskriterien, Fallzahlen, Ethnizität und Definitionen der Krankheitsausprägung zurückzuführen. Jedoch gibt es überzeugende Evidenz dafür, dass spezifische Polymorphismen als Risikofaktoren für die Ausprägung abhängiger Krankheiten anzusehen sind (van Sorge et al., 2003).

2.6 Rolle des CRP als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen

Durch die „Centers for Disease Control and Prevention“ und die „American Heart Association“ wurde CRP aufgrund seiner analytischen Charakteristika im Vergleich zu anderen inflammatorischen Biomarkern als am potentesten und geeignetsten für den klinischen Gebrauch als unabhängigen Prognosemarker kardiovaskulärer Erkrankungen beurteilt (Pearson TA et al., 2003). Dabei wurde eine high sensitive (hs) CRP-Konzentration von <1 mg/l als wenig riskant und Serumspiegel zwischen 1-3 mg/l als intermediär gefährdend beurteilt. Patienten mit einem CRP von >3mg/l jedoch wurden in eine Hochrisikogruppe eingestuft (Pearson TA et al., 2003). Bei Konzentrationen >10mg/l allerdings wurde empfohlen, den Wert zunächst nicht als Prognosemarker heranzuziehen, sondern primär eine Infektion oder ein Trauma auszuschließen. Auch in der „Women`s health Study“ konnten Ridker et al zeigen, dass anhand des CRP-Spiegels additiv zu LDL-Cholesterin und dem Framingham 10-Jahres Risikoscore zukünftiges Erkranken an kardiovaskulären Erkrankungen abgeschätzt werden kann (Ridker PM et al., 2000).
CRP unterliegt keiner zirkadianen Variabilität wie sie bei Zytokinen, z. B. dem IL-6 beobachtet wird (Meier-Ewert HK et al., 2001) und es bestehen keine saisonalen Abhängigkeiten wie beispielsweise für Fibrinogen berichtet (Fröhlich M et al., 1997). Das akute-Phase-Protein weist eine lange Halbwertszeit auf und scheint über längere Zeitperioden bei den meisten Individuen konstant zu persistieren. Zwillingsstudien zeigten, dass ein erheblicher genetischer Einfluss auf den CRP-Grundspiegel existiert (Pepys MB et al., 2003).

Bei Patienten mit traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren weist CRP gehobene Grundspiegel auf (Koenig et al., 2004). Bei Menschen mit chronisch inflammatorischen und Autoimmunerkrankungen können die Spiegel von CRP und anderen Inflammationsmarkern ebenfalls chronisch erhöht sein, wobei eine Fülle an Studien zeigen konnte, dass Patienten mit diesen Konditionen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen besitzen (Solomon DH et al., 2003; Dessein PH et al., 2002). High sensitive CRP-Spiegel wurden weiterhin in Serien von 302 Autopsien untersucht, wobei bei den verstorbenen Männern und Frauen als einzige inflammatorische Kondition die Atherosklerose gefunden werden konnte. Die niedrigste Serum hs-CRP Elevation wurde hierbei bei denjenigen detektiert, die an nichtkardialen Ursachen verstorben waren (Burke AP et al., 2002). Stabile Plaques zeigten geringe, erosive Plaques relevante hs-CRP-Elevationen, signifikante hs-CRP-Werte wurden jedoch bei rupturierten Plaques vermerkt (Burke AP et al. 2002).

Die potente Assoziation zwischen CRP und kardiovaskulärer Prognose wurde erstmals bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (AKS) illustriert (Berk BC et al., 1990; Liuzzo G et al., 1994). Diejenigen AKS Patienten mit einem CRP-Serumspiegel von >3,0 mg/l hatten häufigere ischämische Episoden als AKS Patienten mit einem CRP-Spiegel von <3,0 mg/l (Liuzzo G et al, 1994). In einer Langzeitstudie mit einem follow-up von 4 Jahren betrug die Rate kardiovaskulär bedingter Todesfälle bei Patienten mit CRP-Spiegeln von 2-10 mg/l 7,8%, bei denjenigen mit CRP-Spiegeln von >10 mg/l war die Rate mit 16,5% jedoch doppelt so hoch (Lindahl B et al., 2000). Weiterhin kann CRP auch in der Risikoabschätzung weiterer Episoden bei Patienten mit bereits stattgehabtem Myokardinfarkt fungieren (Retterstol L et al., 2002).

Ein myokardialer Infarkt führt zur Nekrose von kardialem Muskelgewebe, was als Stimulus der CRP-Produktion fungiert (Casl MT et al., 1995). HsCRP-Spiegel steigen parallel zum Ausmaß der Muskelnekrose und erreichen ihren Höhepunkt zwei Tage nach dem Ereignis mit anschließendem Abfall. Noch 14 Tage danach persistierende hs-CRP-Elevationen suggerieren eine anhaltende Inflammation und weisen auf rekurrierende Ereignisse hin (Morrow DA et al., 1998).

Wie bereits erwähnt besitzt CRP auch die Fähigkeit, Mechanismen der vaskulären Atheroskleroseprogression über verschiedene Ansatzpunkte zu triggern (Pepys MB et al., 2003). Weiterhin sprechen experimentelle Daten dafür dass die CRP-

Expression in atheromatösen Plaques im Vergleich zu normalem arteriellen Gewebe hochreguliert ist (Yasojima K et al., 2001).
CRP gilt additiv auch als robuster Prognosemarker für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes und Schlaganfalls sowie die Entwicklung einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (Albert CM et al., 2002), was es zu einem globalen Marker sowie Faktor des vaskulären Risikos macht.

2.7 Fragestellung der Arbeit und Pilotstudie

Diese Arbeit soll den Einfluss dreier SNPs des CRP-Gens sowie der Interaktion zwischen CRP und seinem FcγRIIa-Rezeptor auf Initiation, Progression und klinischer Manifestation der Atherosklerose bei Patienten mit verschiedenen Stadien der KHK untersuchen. Es erfolgte die Genotypisierung genannter SNPs und des Fcγ-RIIa-Rezeptors bei insgesamt 836 Patienten kaukasischer Ethnizität mit manifester stabiler und instabiler Angina pectoris, sowie bei 199 gesunden Kontrollpatienten. Die Einteilung in die klinischen Stadien wurde hierbei primär hinsichtlich ihrer Erstmanifestation vorgenommen. Weiterhin wurden auch geschlechts- oder altersspezifische Unterschiede bei der Primärmanifestation der verschiedenen Patientenkollektive berücksichtigt, was die Frage klären kann, ob diese Polymorphismen mit dem Auftreten der klinischen Symptomatik der KHK assoziiert sind und in Folge als unabhängige genetische Risikofaktoren für die Plaquedestabilisierung angesehen werden müssen.
Es besteht bereits eine Vorarbeit aus dem Labor für Molekulare Kardiologie zur Typisierung des FcγRIIa Polymorphismus bei 162 Patienten kaukasischer Ethnizität, wobei 59 Patienten eine stabile Angina pectoris (SAP), 37 Patienten eine instabile Angina pectoris (IAP) und 66 Patienten einen akuten Myokardinfarkt (AMI) aufwiesen. Es wurden dabei 187 gesunde Kontrollpatienten (Non-CAD) mitgeführt.
Dabei konnte eine signifikante Assoziation der IAP als Erstmanifestation einer KHK mit dem Auftreten des FcRIIa-R/R131-Genotyps detektiert werden, im Vergleich zu Patienten mit primärer SAP (FcγRIIa-R/R131 vs Non-R/R-131 p=0,0001) und zu gesunden Kontrollpersonen (FcγRIIa-R/R131 vs Non-R/R131 p=0,024). Ein signifikant niedrigeres Risiko für ein koronares Ereignis zeigte jedoch der FcγRIIa-H/H131 Genotyp an (IAP vs SAP: FcγRIIa-H/H131 vs Non-H/H131 p=0,004).

Tabelle 1: Verteilung der Genotypen in der Pilotstudie nach Studienkollektiven (H: Histidin, R: Arginin)

Genotyp	SAP	IAP	AMI	Non-CAD
H/H 131	6 (24%)	2 (10%)	7 (15%)	52 (28%)
R/H 131	18 (72%)	10 (53%)	28 (59,5%)	84 (45%)
R/R 131	1 (4%)	7 (37%)	12 (25,5%)	51 (27%)
Gesamt	**25 (100%)**	**19 (100%)**	**47 (100%)**	**187 (100%)**

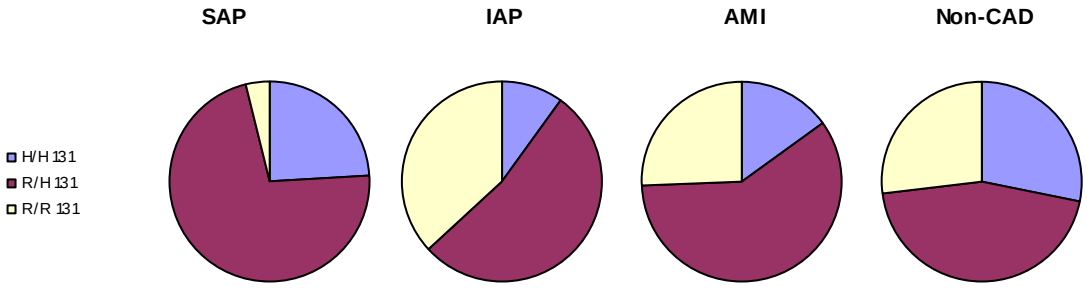


Abb. 7: Übersicht über Verteilung des FcγRIIa-Genotyps in den verschiedenen Studienkollektiven

Diese Tatsache suggeriert eine relevante protektive Wirkung des FcγRIIa-H/H131 gegen die Entwicklung einer instabilen Angina pectoris. Da der FcγRIIaR/R131 Genotyp eine signifikant höhere Frequenz bei Patienten mit IAP und akutem Koronarsyndrom aufweist, ist er mit einer eher ungünstigen kardiovaskulären Prognose gekoppelt. Die vorliegende Doktorarbeit knüpft an diese Pilotstudie an. Ziel war es, eine deutlich höhere Anzahl an entsprechenden Patienten zu rekrutieren und die Ergebnisse aus der Pilotstudie zu bestätigen.

Im Rahmen unserer Pilotstudie wurden auch weiterführende statistische Analysen durchgeführt bezüglich der Sensitivität und Spezifität des Non-R/R131 Genotyps zur Identifikation einer SAP und des Non-H/H131 Genotyps zur Identifikation eines AKS. Der Non-R/R131 Genotyp weist hierbei eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 31% für die Detektion von SAP-Patienten auf, der Non-H/H131 Genotyp eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 34% zur Detektion von ACS-Patienten.

Zusätzliche Analysen zeigten interessanterweise keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit des FcγRIIaR/R131 Genotyps bei Patienten mit AMI im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Eine Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass bis zu 30% der einen akuten Myokardinfarkt erleidenden Personen sofort an plötzlichem Herztod oder akutem myokardialen Pumpversagen versterben. Da diese Patienten das Krankenhaus nicht mehr erreichen, konnten sie durch unsere Pilotstudie nicht rekrutiert werden und entzogen sich unserer Analyse.

3 Material und Methoden

In dieser Studie wurden 332 Patienten mit instabiler Angina pectoris, 504 Patienten mit stabiler Angina pectoris und 199 gesunde Kontrollpersonen bezüglich ihres FcγRIIa-Genotyps sowie ihrer 2667CG-, 1919AT- und 1440ACT-Allele des CRP-Gens untersucht. Alle Patienten und Kontrollprobanden sind kaukasischer Ethnizität.

3.1 Definition der Studiengruppen

3.1.1 Kontrollgruppe

Die Gruppe beinhaltet ein gesundes Kontrollkollektiv (Non-CAD). Diese Personen gaben in einem ausführlichen Anamnesegespräch keinerlei klinische Angina pectoris Beschwerden an, weiterhin konnte durch nicht pathologische Elektrokardiographie, Echokardiographie sowie Koronarangiographie das Vorhandensein einer koronaren Herzkrankheit ausgeschlossen werden.
Zusätzlich lagen bei diesen gesunden Personen keine signifikanten Risikofaktoren für die Entwicklung einer klinisch relevanten Atherosklerose vor, wie Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Hypertonie, Diabetes mellitus und familiäre Prädisposition.

3.1.2 Gruppe „Stabile Angina Pectoris“

Die Klassifizierung der Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) erfolgte durch den angiographischen Nachweis von Stenosen in den Koronarien, wobei mindestens ein Koronargefäß eine Stenose von > 50% aufwies.
Bei diesen Patienten wurde weiterhin ein positives Stress-Echo oder Belastungs-EKG dokumentiert. Ein Akutes Koronarsyndrom wurde in diesem Kollektiv zum einen durch die Ableitung eines Ruhe-EKGs, zum anderen durch eine negative Enzymdiagnostik ausgeschlossen.

3.1.3 Gruppe „Instabile Angina Pectoris“

Als Basis für die Eingruppierung der Patienten mit instabiler Angina Pectoris (IAP) wurde die aktualisierte Braunwald-Klassifikation (Hamm und Braunwald, 2000) eingesetzt, wobei zur Homogenisierung der Gruppe nur Patienten der Klasse Braunwald III B in die Studie impliziert wurden.
Die Braunwald-Gruppe III ist dergestalt charakterisiert, dass Patienten innerhalb der letzten 48 Stunden in Ruhe Angina pectoris Anfälle aufweisen müssen. In die Subgruppe B werden weiterhin nur Patienten eingegliedert, deren Angina pectoris koronarbedingt ist und nicht extrakardial verursacht wurde. Weiterführend können die IAP-Patienten nach der Braunwald-Klassifikation hinsichtlich ihres Troponins unterteilt werden. Dabei wird innerhalb der Gruppe III B zwischen positiven (III B $_{\text{Troponin positiv}}$) und negativen (III B $_{\text{Troponin negativ}}$) Patienten unterschieden.

3.2 Ausschlußkriterien der Studie

Bezüglich der Rekrutierung der verschiedenen Patienten wurden einige Ausschlusskriterien definiert um die Patientengruppen weitestgehend zu vereinheitlichen und eventuelle Störfaktoren zu beseitigen:
Infektionen, Fieber, Anämie, Malignome, thyreotoxische Krisen, hypertone Entgleisungen und akute Lungenembolien. Weitere kardiale Krankheiten, wie zum Beispiel Kardiomyopathien, Myokarditiden und sowohl rechts- als auch linksventrikuläre Insuffizienzen, ausgenommen hiervon minimale Mitralklappeninsuffizienzen (Yeghiazarians er al., 2000).

3.3 Standardisierte Blutentnahme

Vor der Blutentnahme wurde jeder Patient über deren Zweck aufgeklärt und das Einverständnis eingeholt. Die entnommenen Blutproben wurden in Citrat-Röhrchen (Sarstedt, Germany) und Serum-Monovetten (Sarstedt, Germany) abgefüllt. Anschließend erfolgte der zeitnahe Transfer in unser Labor für molekulare Kardiologie der Medizinischen Klinik II der Universität Erlangen und die

Aufbereitung des Materials. Die Methodenwahl der Probenvorbereitung wurde derart getroffen, dass alle Patientenproben mit gleichem zeitlichen Ablauf sowie mit gleicher Methodik verarbeitet wurden und somit eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb der Studie vorliegt.

3.4 Weiterverarbeitung des Blutes:

Aus dem mit Natrium-Citrat antikoagulierten Vollblut wurden die zur DNA-Extraktion benötigten Monozyten extrahiert. Das in den Serum-Monovetten enthaltene Serum wurde durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 1500 g von den korpuskulären Blutbestandteilen getrennt und für eventuell nachfolgende Analysen in Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.4.1 Monozytenextraktion:

Zur Gewinnung von Monozyten aus peripher-venösem, Natrium-Citrat antikoaguliertem Blut über Ficoll-Aufreinigung wurden BD-Vacutainer® Röhrchen verwendet.
BD-Vacutainer beinhalten in ihrem unteren Abschnitt eine Polyester-Gel-Schicht, die während eines zwanzigminütigen Zentrifugationsschrittes bei 1650 rpm nur für Erythrozyten und Leukozyten, nicht aber für Monozyten und Thrombozyten durchlässig ist. Folglich werden somit über Gradientenzentrifugation die Blutkörperchen aufgetrennt, wobei sich schließlich über der Polyester-Gel-Schicht die benötigten Monozyten befinden. Um diese nun vollständig aufzureinigen, wurde dieser Teil des Serums zunächst 5 Minuten bei 1200 rpm, der verbleibende Überstand weitere 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert.
Am Ende der durchgeführten Ficoll-Aufreinigung fanden sich die Monozyten der ursprünglichen Vollblut-Probe als kleines weißes Pellet am Boden der Eppendorf-Cups und wurden bei -80°C bis zur folgenden DNA-Extraktion aufbewahrt.

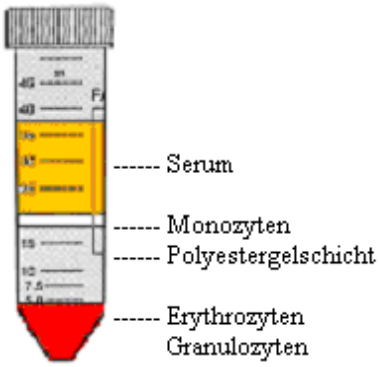


Abb. 8: *Prinzip der Ficoll-Aufreinigung:* BD-Vacutainer® Röhrchen trennen mittels ihres Polyestergels Monozyten und von Erythrozyten und Granulozyten

3.4.2 DNA-Isolation:

Zur Bestimmung der Fcγ Polymorphismen wurde aus den extrahierten Monozyten mit Hilfe des kommerziell erhältlichen „Wizzard Genomic DNA Purification Kit“ von Promega eine standardisierte Isolation genomischer DNA durchgeführt. Der Vorteil in der Verwendung dieses standardisierten Kits besteht darin, dass die Verarbeitung der Proben homogenisiert und somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse optimiert wird.

Im ersten Schritt wurden die Monozytenpellets nach Auftauen und ausgiebigem Vortexen mit 900µl „Cell Lysis Solution“ versetzt, die innerhalb einer zehnminütigen Inkubation eventuell noch vorhandene Erythrozyten lysierte. Nun wurden die Eppendorf-Cups zehn Minuten mit 2000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abpipettiert. Durch gründliches 15-sekündiges Vortexen sollte nun eine effiziente Lyse der Monozyten erreicht werden.

Der folgende Schritt wurde mit der Intention durchgeführt, die Kernmembran zu lysieren und somit die DNA für unsere Analyse zugänglich zu machen. Zunächst wurden 400µl „Nuclei Lysis Solution“ zu den resuspendierten Zellen gegeben. Um die Lyse der Zellmembranen zu vervollständigen wurden die Lösungen nochmals resuspendiert und anschließend so lange bei 37°C inkubiert, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. Zur Beseitigung des die spätere Photometrie verfälschenden RNA-Proteins wurden jetzt 2µl „RNAase Solution“ hinzupipettiert, das nukleäre

Lysat 5 mal invertiert, bei 37°C 15 Minuten inkubiert und am Ende auf Raumtemperatur abgekühlt.
Im nächsten Schritt wurde das im nukleären Lysat befindliche Protein präzipitiert. Dafür wurde 100µl „Protein Precipitation Solution“ hinzugefügt und diese Lösung sorgfältig für 20 Sekunden gevortext. Nach dem nächsten Zentrifugationsschritt bei 2000 x g für 10 Minuten wurde das präzipitierte Protein als ein braunes Pellet sichtbar und im Überstand befand sich nun die gewünschte DNA. Der Überstand wurde jetzt gewissenhaft abpipettiert und in 400µl Isopropanol beinhaltende Eppendorf Cups exportiert. Durch mehrmalige Inversion wurde die DNA gewaschen und schließlich als weiße, fadenartige Stränge sichtbar. Anschließend wurden die Eppendorf Cups 3 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert um die DNA als kleines weißes Pellet am Boden der Cups zu lokalisieren. Der Überstand wurde wiederum verworfen, weitere 400µl 70%igen Ethanols hinzupipettiert, die DNA durch mehrmalige Inversion gewaschen und die Cups nochmals bei 2000 x g für 3 Minuten zentrifugiert.
Das DNA-Pellet war an dieser Stelle stets sehr lose, weswegen hier besondere Sorgfalt beim Abpipettieren des Überstands geboten war um die zarten DNA-Fäden nicht zu aspirieren. Nachdem die DNA 15 Minuten bei Luft trocknen gelassen wurde, wurde sie mittels 100µl „DNA Rehydration Solution“ rehydriert und bis zur anschließenden photometrischen Messung bei -20°C gelagert.

3.4.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäuren

Absorptionsmessungen erfolgen im ultravioletten und sichtbaren Bereich des Lichts. Die Absorption von DNA, RNA, Oligonukleotiden und Mononukleotiden wird bei 260 nm detektiert. Neutrale bis leicht alkalische Lösungen eignen sich als Messmedien (Wilfinger WW et al., 1997). Bezogen auf eine Küvettenschichtdicke von 1 cm entspricht unter diesen Pufferbedingungen eine Absorption von 1 OD (Optische Dichte) bei 260 nm ca. 50 µg/ml dsDNA, 37 µg/ml ssDNA, 40 µg/ml RNA oder ca. 30 µg/ml Oligonukleotide. Absorptionsmessungen sollten nur oberhalb einer Extinktion von 0,1 durchgeführt werden, um gut reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Verunreinigungen der Probe können durch die Verhältnisbildung (Ratio) verschiedener Absorptionswerte erkannt werden. Da Proteine bei 280 nm absorbieren, kann man die Reinheit der Nukleinsäurelösung anhand der Ratio E260/280 abschätzen. Unter neutralen bis leicht alkalischen pH-Bedingungen sollte der Quotient bei reiner DNA ca.1,8 und bei reiner RNA ca. 2,0 betragen (Wilfinger WW et al., 1997). Diese Werte werden durch Proteinkontaminationen verringert. Eine hohe Absorption bei 230 nm reflektiert Verunreinigungen z. B. durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenole oder aromatische Verbindungen (Sambrook J et al., 2001). Bei reinen Proben sollte der Quotient E260/E230 größer 2,0 sein.

3.4.4 Genotypisierung des FcγRIIa/131-Polymorphismus mittels „nested PCR“:

Zur Genotypisierung des im Exon 4 befindlichen FcγRIIa/131-Polymorphismus wurde eine Allel-spezifische „nested-PCR“ verwendet, die von Carlsson et al. (Blood 1998) beschrieben ist. Unterschiedlich zu Carlssons Beschreibung arbeiteten wir jedoch mit Fluoreszenz-markierten Primern, wodurch ein höherer Durchsatz und eine noch effizientere Auswertung erreicht werden konnten.

Im ersten PCR-Schritt musste die FcγRIIa-Variante als ein Prä-PCR-Produkt amplifiziert werden, da es mehrere paraloge Gene mit hoher Sequenzhomologie zu FcγRIIa gibt. Dies erfolgte mittels des Gen-spezifischen Primerpaars P52/P63, mit dem das Produkt anschließend in beide Richtungen sequenziert wurde. Zur Bestätigung der Spezifität dieser Reaktion und der Diskriminierung zwischen den paralogen Genen, wurden sie an polymorphen Positionen angesetzt. Das entstandene Gen-spezifische Produkt war 957bp lang und diente als Ausgangsprodukt für eine zweite PCR-Reaktion mit weiter innen liegenden Primern, die nun Allel-spezifische Produkte amplifizierte. Diese Fluoreszenz-markierten, Allel-spezifischen Primer überlappten am 3`-Ende mit dem jeweiligen Polymorphismus und beinhalteten an den Positionen c.502 und c.504 zur besseren Diskriminierung der Allele zwei weitere artifizielle Basen, wobei der Primer P5G-F für das c.507G-Allel und der Primer P4A-H für das c.507A-Allel verwendet wurden. Zusätzlich wurde auch die Fluoreszenz-markierte Version von P63 (P63-T) mitgeführt um ein größeres Allel-unabhängiges Kontrollprodukt zu erhalten. Da der von Carlsson et al. beschriebene Gegenprimer P13 am 5’-Ende Sequenzabweichungen zur genomischen Sequenz

aufwies (vermutlich auf der damaligen unvollständigen Sequenz basierend), diente in unserer Analyse P13altern als Gegenprimer für alle 3 eingesetzten Primer. Die Produkte des zweiten PCR-Schrittes mit den Primern P-63-T, P5G-F, P4A-H und P13altern konnten je nach Genotyp in 3 Fluoreszenzen gefärbt sein. Im heterozygoten Fall erhielt man ein 305bp großes, Allel-unabhängiges Kontrollprodukt und weitere zwei 270bp große, Allel-spezifische Produkte mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen. Im homozygoten Fall hingegen fand sich neben dem Kontrollprodukt nur ein weiteres PCR-Produkt in einer Fluoreszenz, was je nach Farbe entweder die Homozygotie des untersuchten Patienten für das Allel A oder für das Allel G nachwies.

Die Analyse der fluoreszenten Produkte und die Auswertung nach Größe und Farbe erfolgte schließlich mit Hilfe eines Kapillarsequenzierautomaten.

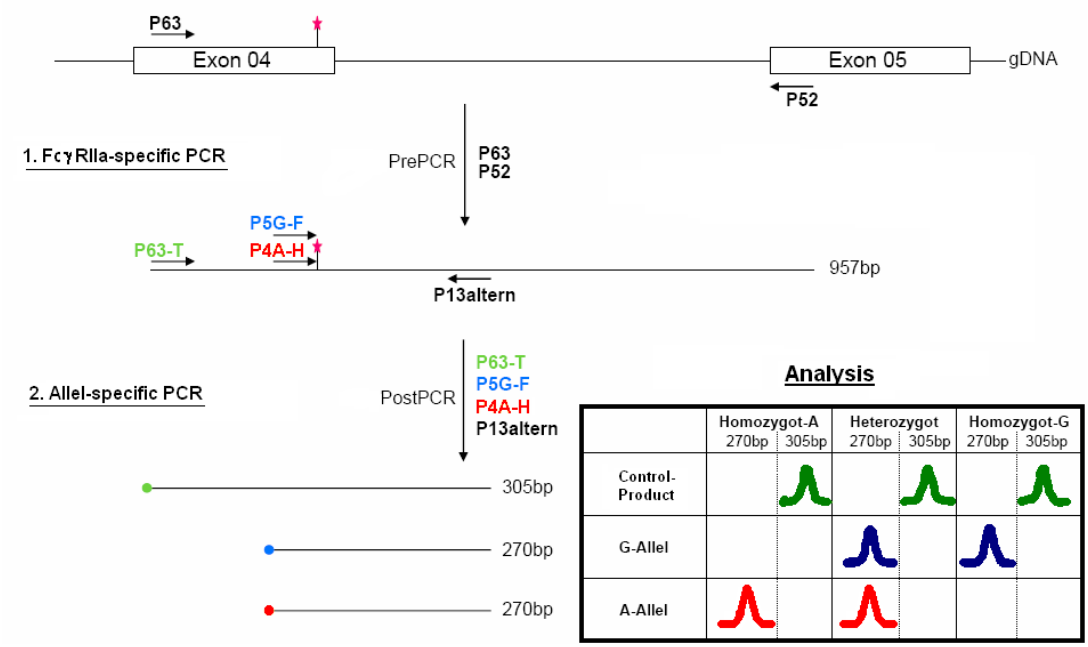


Abb. 9: *Prinzip der „Nested-PCR“:* Ein Prä-PCR-Produkt der ersten Amplifikation diehnt als Matrize für den zweiten PCR-Schritt.

3.5 Statistische Analysen

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit parametrischer Tests wurden explorative Datenanalysen über die Normalverteilung in den Kollektiven durchgeführt. Besonders von der Normalverteilung abweichende Werte wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Zum Vergleich normalverteilter Variablen der Probanden aus den Kollektiven SAP, IAP, AMI und Non-CAD verwendeten wir den X^2-Test sowie den Fisher´s Test. Die Signifikanz von Unterschieden der Parameter innerhalb der Kohorten wurden mittels nichtparametrischem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test detektiert. Die Ergebinisse sind in Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

Die Odds Ratio mit ihrem 95% Konfidenzintervall und *p*- Werte mit Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit wurden für alle Gruppen berechnet. Ab einem Irrtumswahrscheinlichkeitswert von $p < 0{,}05$ wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

Um unabhängige Risikofaktoren im Vergleich der Gruppen SAP und IAP zu detektieren wurde als Regressionsverfahren eine Multivariatenanalyse durchgeführt mit klassischen atherogenen Risikofaktoren als dichotomen Variablen.

4 Resultate

4.1 Patientencharakteristik

Bei allen rekrutierten Patienten wurde eine ausführliche Anamnese bezüglich Alter, Vorerkrankungen, momentaner Medikation sowie Nikotinabusus durchgeführt. Relevante laborchemische Daten wurden über das Zentrallabor der Universitätsklinik aufgenommen. Diese umfassten das LDL-, HDL-, und Gesamtcholesterin, das C-reaktive Protein (CRP), die Thrombozyten- und Leukozytenzahl, die Kreatinkinase (CK) sowie das Troponin I. Diese Daten wurden sowohl erfasst als auch analysiert.

In der Analyse der Daten war auffällig, dass die Probanden mit instabiler Angina pectoris signifikant ($p<0,05$) höhere Werte von C-reaktivem Protein aufwiesen als Patienten mit stabiler Angina pectoris. Weiterhin war der Risikofaktor Nikotinabusus in der Gruppe der Patienten mit instabiler Angina pectoris signifikant ($p<0,05$) häufiger zu verzeichnen.

Hinsichtlich der aktuellen Medikation zeigte sich im Kollektiv instabile AP ein signifikant höherer Anteil an mit Statinen lipidsenkend therapierter Patienten ($p=0,007$). Bezüglich der Therapie mit Betablockern, ACE-Hemmern sowie Acetylsalicylsäure ließen sich keine Unterschiede registrieren.

Die Auswertung aller anderen Parameter wie Alter, Geschlecht, sonstigem kardiovaskulären Risikoprofil, des Gesamt-, HDL- sowie LDL-Cholesterins, der Höhe an Leukozyten, Thrombozyten, der Kreatinkinase und des Troponin I zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Die Eigenschaften der Studienpatienten sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2: Eigenschaften der Studienpatienten

	Stabile AP	**Instabile AP**	***P* Wert**
Patienten – Anzahl	505	332	
Alter – Jahre	68.5 ± 9.1	68.5 ± 9.3	0.81
Body Mass Index – kg/m²	28.8 ± 5.1	28.5 ± 4.9	0.82
Maskulines Geschlecht – %	70.1	75.8	0.20
Raucher – %	22.9	32.8	0.02
Hypertonie – %	86.7	89.2	0.47
Diabetes – %	30.6	28.5	0.68
Laborparameter			
Gesamtcholesterin – mmol/L	5.2 ± 1.1	5.5 ± 1.3	0.14
LDL – mmol/L	3.5 ± 1.0	3.6 ± 1.0	0.32
HDL – mmol/L	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.4	0.10
Kreatinkinase – U/L	124.9 ± 76.7	132.8 ± 84.0	0.64
Troponin I – ng/mL	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.72
Leukozyten – $10^3/\mu L$	7476 ± 2100	7391 ± 1971	0.97
Thrombozyten – $10^3/\mu L$	235.7 ± 65.8	235.8 ± 58.1	0.42
CRP – mg/L	2.60 ± 2.25	3.09 ± 2.65	0.04
Medikation			
Betablocker – %	82.3	85.2	0.52
ACE-Hemmer – %	62.2	65.1	0.62
Aspirin – %	88.8	94.2	0.07
Statine – %	72.5	83.2	0.007

Angabe der Werte in Mittelwert +/- Standardabweichung

4.2 Analyse des FcγRIIa-Rezeptors (rs1801274):

Es wurden insgesamt 332 Patienten mit instabiler AP, 505 Patienten mit stabiler AP und 200 Patienten mit koronarangiographischem Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung hinsichtlich ihres FcγRIIa-Rezeptor-Polymorphismus untersucht. In der Patientengruppe mit stabiler AP fanden wir bei 35,2% den Rezeptor-Genotyp HH, bei 53,9% den Subtyp RH sowie bei 10,9% den Genotyp RR. In dem Kollektiv mit instabiler AP zeigte sich der HH-Genotyp bei 21,4% der Probanden, der Genotyp RH bei 38,9% und der Subtyp RR bei 39,8%. Das Kontrollkollektiv wies bei 26,0% der Probanden den Rezeptor-Genotyp HH, bei 55,5% den Subtyp RH sowie bei 18,5% den Subtyp RR auf.

Tabelle 3: Verteilung des FcγRIIa-Genotyps innerhalb der Kollektive (H: Histidin, R: Arginin)

	SAP	**IAP**	**Non-CAD**
HH	178 (35,2%)	71 (21,4%)	52 (26,0%)
RH	272 (53,9%)	129 (38,9%)	111 (55,5%)
RR	55 (10,9%)	132 (39,8%)	37 (18,5%)
Gesamt	**505 (100%)**	**332 (100%)**	**200 (100%)**

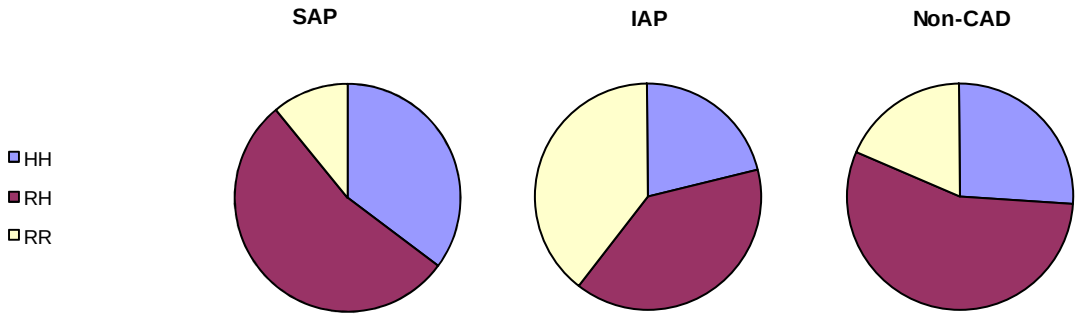


Abb. 10: Übersicht über die Verteilung des FcγRIIa-Genotyps

Im Vergleich der Gruppe SAP mit dem Kontrollkollektiv zeigte sich ein signifikant höheres Auftreten des Genotyps HH (HH vs non-HH: p=0,018; OR=1,55) sowie ein

signifikant geringeres Vorkommen des Rezeptor-Subtyps RR (RR vs non-RR: p=0,007; OR=0,54). Hinsichtlich des Rezeptor-Genotyps RH fanden wir ein nicht signifikant erniedrigtes Vorkommen in der Gruppe SAP (RH vs non-RH: p=0,694; OR=0,54), also eine annähernde Gleichverteilung des Genotyps.

Tabelle 4: Vergleich der Gruppe SAP mit dem Kontrollkollektiv

SAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
W HH vs non-HH	0,018	*	1,55 (1,08-2,23)
i RH vs non-RH	0,694	n.s.	0,94 (0,67-1,30)
r RR vs non-RR	0,007	*	0,54 (0,34-0,85)
d **Gesamt**	**0,006**	*****	

Wird nun die Gruppe IAP mit den gesunden Kontrollprobanden verglichen, lässt sich eine annähernde Gleichverteilung des Genotyps HH nachweisen (HH vs non-HH: p=0,221; OR=0,77), während der Subtyp RR signifikant vermehrt sowie der Subtyp RH signifikant vermindert vorkommt (RR vs non-RR: p=<0,001; OR=2,91; RH vs non-RH: p=<0,001; OR=0,51).

Tabelle 5: Vergleich der Gruppe IAP mit dem Kontrollkollektiv

IAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
HH vs non-HH	0,221	n.s.	0,77 (0,51-1,17)
RH vs non-RH	< 0,001	*	0,51 (0,36-0,73)
RR vs non-RR	<0,001	*	2,91 (1,91-4,42)
Gesamt	**<0,001**	*****	

In der Gegenüberstellung des Kollektivs IAP mit der Gruppe SAP fanden wir schließlich eine signifikant höhere Persistenz des Genotyps RR (RR vs non-RR: p=<0,001; OR=5,40), jedoch ein signifikant geringeres Vorkommen der beiden übrigen Genotypen RH sowie HH (RH vs non-RH: p=<0,001; OR=0,54; HH vs non-HH: p=<0,001; OR=0,50).

Tabelle 6: Vergleich der Kollektive „Instabile AP“ und „Stabile AP“

IAP vs SAP	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
HH vs non-HH	<0,001	*	0,50 (0,36-0,69)
RH vs non-RH	<0,001	*	0,54 (0,41-0,72)
RR vs non-RR	<0,001	*	5,40 (3,78-7,71)
Gesamt	**<0,001**	*****	

4.3 Analyse CRP-Gen 2667C-Allels (rs1800947):

Es wurden insgesamt 316 Patienten mit instabiler AP, 476 mit stabiler AP sowie 196 Probanden mit invasivem Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung untersucht. In der Gruppe der Patienten mit IAP wiesen 84,8% das Allel CC, 13,9% das Allel CG und nur 1,3% den Genotyp GG auf. Das Kollektiv SAP zeigte in 88,4% das Allel CC, in 11,1% den Genotyp CG und in 0,4% das Allel GG. Das gesunde Kontrollkollektiv hatte in 88,3% der Fälle das Allel CC, in 11,2% das Allel CG sowie in 0,5% das Allel GG.

Tabelle 7: Verteilung der Allele CC, CG und GG innerhalb der Studienkollektive

	IAP	SAP	Non-CAD
CC	268 (84,8%)	421 (88,4%)	173 (88,3%)
CG	44 (13,9%)	53 (11,1%)	22 (11,2%)
GG	4 (1,3%)	2 (0,4%)	1 (0,5%)
Gesamt	**316 (100%)**	**476 (100%)**	**196 (100%)**
Ausfälle	16	28	3

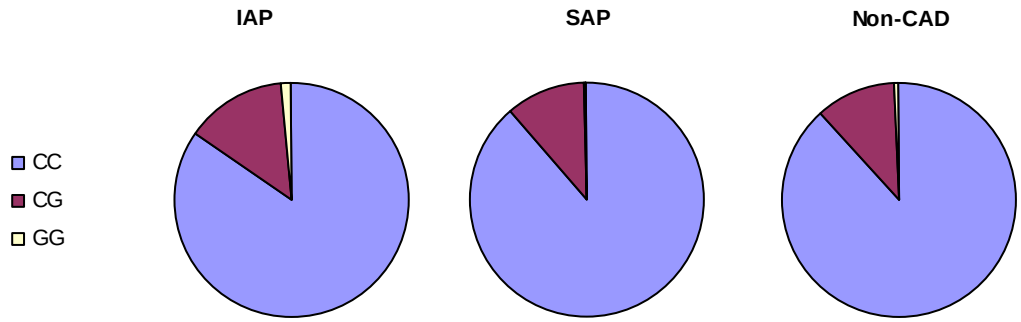


Abb. 11: Verteilung der Allele innerhalb der Studiengruppen

Im Vergleich der Gruppe SAP mit der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden fanden wir keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der drei Allele (CC vs non-CC: p=0,947; OR=1,02; CG vs non-CG: p=0,973; OR=0,99; GG vs non-GG: p=0,873; OR=0,82).

Tabelle 8: Vergleich der Gruppe SAP mit dem Kontrollkollektiv

SAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
CC vs non-CC	0,947	n.s.	1,02 (0,61-1,71)
CG vs non-CG	0,973	n.s.	0,99 (0,58-1,68)
GG vs non-GG	0,873	n.s.	0,82 (0,07-9,13)
Gesamt	**0,987**	**n.s.**	

Auch in der Gegenüberstellung des Kollektivs IAP mit den gesunden Kontrollen zeigte sich eine relativ übereinstimmende Verteilung der drei Allele (CC vs non-CC: p=0,27; OR=0,74; CG vs non-CG: p=0,38; OR=1,28; GG vs non-GG: p=0,4; OR=2,50;), die minimalen Unterschiede waren also nicht signifikant.

Tabelle 9: Vergleich der Gruppe IAP mit dem Kontrollkollekiv

IAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
CC vs non-CC	0,27	n.s.	0,74 (0,44-1,26)
CG vs non-CG	0,38	n.s.	1,28 (0,74-2,21)
GG vs non-GG	0,40	n.s.	2,50 (0,28-22,53)
Gesamt	**0,46**	**n.s.**	

Stellten wir nun die Patienten mit stabiler und instabiler AP gegenüber, fanden wir erwartungsgemäß auch hier eine annähernde Gleichverteilung der drei Allele CC, CG und GG (CC vs non-CC: p=0,14; OR= 0,73; CG vs non-CG: p=0,24; OR= 1,29; GG vs non-GG: p= 0,18; OR=3,04;).

Tabelle 10: Vergleich der Kollektive „Stabile AP“ und „Instabile AP“

IAP vs SAP	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
CC vs non-CC	0,14	n.s.	0,73 (0,48-1,11)
CG vs non-CG	0,24	n.s.	1,29 (0,84-1,98)
GG vs non-GG	0,18	n.s.	3,04 (0,55-16,69)
Gesamt	**0,19**	**n.s.**	

4.4 Analyse des CRP-Gen 1919T-Allels (rs1417938):

Hierbei wurden insgesamt 323 Probanden mit instabiler AP, 482 Patienten mit stabiler AP untersucht, sowie 192 gesunde Kontrollen mitgeführt. Im IAP-Kollektiv zeigten 47,1% der Patienten das Allel AA, 40,9% den Genotyp AT und 12,1% den Genotyp TT. In der Gruppe der Patienten mit stabiler AP fanden wir 45,9% mit dem Genotyp AA, 45,2% mit dem Allel AT sowie 8,9% mit dem Allel TT. Innerhalb des gesunden Kontrollkollektivs wiesen 43,2% den Genotyp AA, 46,9% das Allel AT und 9,9% den Genotyp TT auf.

Tabelle 11: Verteilung der Allele AA, AT und TT innerhalb der Kollektive

	IAP	SAP	Non-CAD
AA	152 (47,1%)	221 (45,9%)	83 (43,2%)
AT	132 (40,9%)	218 (45,2%)	90 (46,9%)
TT	39 (12,1%)	43 (8,9%)	19 (9,9%)
Gesamt	**323 (100%)**	**482 (100%)**	**192 (100%)**
Ausfälle	9	22	7

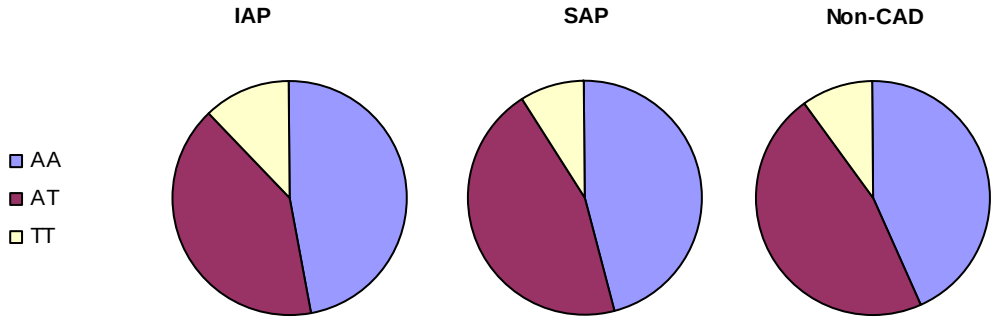


Abb. 12: Übersicht über die Verteilung der Genotypen des SNP rs1417938

Beim Vergleich der Patienten mit stabiler AP mit der Kontrollgruppe zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die Allele waren also annähernd gleich verteilt (AA vs non-AA: p= 0,54; OR= 1,11; AT vs non-AT: p=0,7; OR= 0,94; TT vs non-TT: p=0,69; OR=0,90;).

Tabelle 12: Vergleich der Gruppe SAP mit dem Kontrollkollektiv

SAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
AA vs non-AA	0,54	n.s.	1,11 (0,79-1,56)
AT vs non-AT	0,70	n.s.	0,94 (0,67-1,31)
TT vs non-TT	0,69	n.s.	0,90 (0,51-1,57)
Gesamt	**0,81**	**n.s.**	

Auch die Gegenüberstellung des IAP-Kollektivs mit dem Kontrollkollektiv wies eine relative Gleichverteilung der Genotypen AA, AT und TT auf (AA vs non-AA

p=0,4: OR= 1,17; AT vs non-AT: p=0,18; OR=0,78; TT vs non-TT: p=0,45; OR=1,25;).

Tabelle 13: Vergleich der Gruppe IAP mit dem Kontrollkollektiv

IAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
AA vs non-AA	0,40	n.s.	1,17 (0,81-1,67)
AT vs non-AT	0,18	n.s.	0,78 (0,55-1,12)
TT vs non-TT	0,45	n.s.	1,25 (0,70-2,23)
Gesamt	**0,39**	**n.s.**	

Somit zeigte auch der Vergleich der Gruppe IAP mit der Gruppe SAP wie erwartet nur nichtsignifikante Differenzen in der Aufteilung der drei verschiedenen Allele (AA vs non-AA: p=0,74; OR=1,05; AT vs non-AT: p=0,22; OR=0,84; TT vs non-TT: p=0,15; OR=1,40;).

Tabelle 14: Vergleich der Kollektive „Instabile AP“ und „Stabile AP“

IAP vs SAP	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
AA vs non-AA	0,74	n.s.	1,05 (0,79-1,39)
AT vs non-AT	0,22	n.s.	0,84 (0,63-1,11)
TT vs non-TT	0,15	n.s.	1,40 (0,89-2,22)
Gesamt	**0,25**	**n.s.**	

4.5 Analyse des CRP-Gen 1440-ACT-Allels (rs 3091244):

Hierbei wurden insgesamt 335 Probanden mit instabiler AP und 480 Patienten mit stabiler AP untersucht, sowie 209 gesunde Patienten mitgeführt. Innerhalb der Gruppe instabile AP zeigten 45,1% der Patienten das Allel CC, 35% den Genotyp CT und 15,2% den Genotyp TT. In der Gruppe stabile AP fanden wir 45,2% mit dem Genotyp CC, 32,9% mit dem Allel CT sowie 10,9% mit dem Allel TT.

Innerhalb des gesunden Kontrollkollektivs wiesen 45,6% den Genotyp CC, 32,7% das Allel CT und 11,1% den Genotyp TT auf.

Tabelle 15: Verteilung der Allele CC, CT und TT innerhalb der Kollektive

	IAP	SAP	Non-CAD
CC	116 (45,1%)	178 (45,2%)	78 (45,6%)
CT	102 (35,0%)	173 (32,9%)	74 (32,7%)
TT	39 (15,2%)	43 (10,9%)	19 (11,1%)
Gesamt	**335 (95,3%)**	**480 (89,0%)**	**209 (89,4%)**

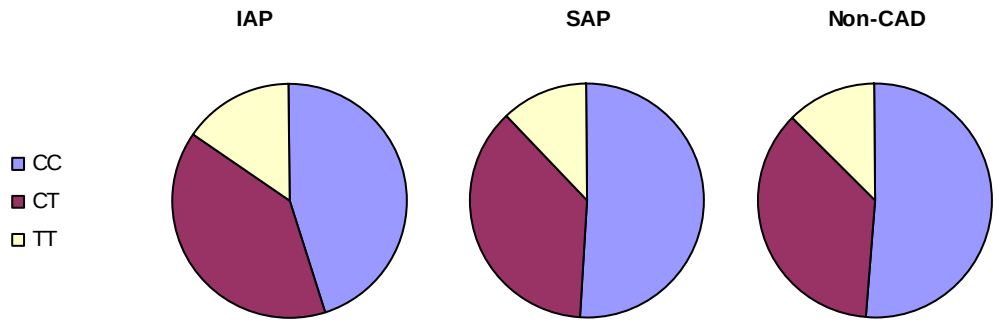


Abb. 13: Übersicht über die Verteilung der Genotypen des SNP rs3091244

Beim Vergleich der Patienten mit stabiler AP mit der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Allele waren also annähernd gleich verteilt (CC vs non-CC: p= 0,92; OR= 0,98; CT vs non-CT: p=0,97; OR= 1,01; TT vs non-TT: p=0,95; OR=0,98;).

Tabelle 16: Vergleich der Gruppe SAP mit dem Kontrollkollektiv

SAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
CC vs non-CC	0,92	n.s.	0,98 (0,69-1,41)
CT vs non-CT	0,97	n.s.	1,01 (0,77-1,32)
TT vs non-TT	0,95	n.s.	0,98 (0,55-1,74)
Gesamt	**0,99**	**n.s.**	

Vergleicht man nun die Gruppe der Patienten mit instabiler AP mit der Gruppe der gesunden Probanden, erhält man ebenso eine Distribution ohne signifikante Unterschiede (CC vs non-CC: p=0,92; OR=0,98; CT vs non-CT: p=0,49; OR=1,11; TT vs non-TT: p=0,23; OR=1, 43).

Tabelle 17: Vergleich der Gruppe IAP mit dem Kontrollkollektiv

IAP vs non-CAD	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
CC vs non-CC	0,92	n.s.	0,98 (0,67-1,45)
CT vs non-CT	0,49	n.s.	1,11 (0,83-1,48)
TT vs non-TT	0,23	n.s.	1,43 (0,80-2,57)
Gesamt	**0,45**	**n.s.**	

In der Gegenüberstellung der Kollektive SAP und IAP konnten wir schließlich ebenfalls eine annähernde Gleichverteilung der Allele detektieren (CC vs non-CC: p=0,99; OR=1,0; CT vs non-CT: p=0,42; OR=1,1; TT vs non-TT: p=0,11; OR=1,46).

Tabelle 18: Vergleich der Kollektive „Instabile AP“ und „Stabile AP“

UAP vs SAP	P-Wert	Signifikanz	Odds Ratio (95%CI)
CC vs non-CC	0,99	n.s.	1,0 (0,73-1,37)
CT vs non-CT	0,42	n.s.	1,1 (0,87-1,39)
TT vs non-TT	0,11	n.s.	1,46 (0,92-2,33)
Gesamt	**0,23**	**n.s.**	

4.6 Multivariate Analysen

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass einzig der FcγRIIaR/R131-Genotyp mit einem häufigeren Auftreten einer instabilen Angina pectoris als Erstmanifestation der Koronaren Herzkrankheit korreliert ist. Um nun die Unabhängigkeit des R/R131-Genotyps von anderen Risikofaktoren nachzuweisen, wurden multivariate Analysen durchgeführt. Als multivariates Analyseverfahren verwendeten wir die Regressionsanalyse mit klassischen atherogenen Risikofaktoren als dichotomen Variablen.

Durch eine acht Schritte umfassende logistische Regressionskalkulation konnte bestätigt werden, dass der R/R131-Genotyp als unabhängiger Prädiktor eines instabilen Verlaufs einer KHK fungieren kann (p<0,001; OR=4,29 [2,33-7,89]).

Es zeigte sich keine Abhängigkeit von anderen klinisch etablierten und prognosebestimmenden Parametern wie hohem Lebensalter (p=0,82), maskulinem Geschlecht (p=0,43), Raucherstatus (p=0,25), einer Hypertonie (p=0,53), einer positiven Familienanamnese (p=0,31), einem Diabetes mellitus (p=0,86) sowie einem CRP-Wert von > 1,88 mg/l (p=0,67).

Eine Korrelation konnte einzig für einen LDL-Cholesterinwert über 4,14 mmol/l nachgewiesen werden (p=0,007; OR=2,23 [1,24-4,01]), so dass hier ein Zusammenhang möglich ist, der weiterer Analysen badarf.

Tabelle 19: Zusammenfassung Multivariatenanalyse, Vergleich IAP vs SAP

IAP vs SAP				
	Erster Schritt		**Letzter Schritt**	
Faktor	**OR (95%CI)**	**P Wert**	**OR (95%CI)**	**P Wert**
R/R vs non-R/R	4,20 (2,25-7,82)	<0,001	4,29 (2,33-7,89)	**<0,001**
Alter > 65 Jahre	1,07 (0,60-1,93)	0,82		
Maskulinität	1,28 (0,69-2,36)	0,43		
Raucher	1,42 (0,78-2,57)	0,25		
Hypertonie	1,31 (0,56-3,10)	0,53		
Familienanamnese	1,36 (0,75-2,44)	0,31		
Diabetes	1,06 (0,59-1,90)	0,86		
LDL>4,14 mmol/l	2,36 (1,30-4,30)	0,005	2,23 (1,24-4,01)	**0,007**
CRP>1,88 mg/l	**1,14 (0,63-2,03)**	**0,67**		

5 Diskussion

5.1 Besprechung der Ergebnisse

Unsere Studie zeigt einen starken Einfluss des funktionellen genetischen Polymorphismus an Aminosäureposition 131 des FcγRIIa-Gens auf den Verlauf der Koronaren Herzkrankheit. Das FcγRIIa-Gen kodiert für den FcγRIIa-Rezeptor, dem Hauptrezeptor des C-reaktiven Proteins (Bharadwaj D et al., 1999). An dieser Position kommt es bei homozygotem Vorliegen zweier Arginin-Allele zu einem erhöhten Risiko eine instabile Angina pectoris als Erstmanifestation der KHK zu erleiden. Die Homozygotie des Histidin-Allels hingegen scheint eher zur Ausprägung einer stabilen Angina pectoris als Erstereignis zu führen. In zahlreichen klinischen Studien wurde bereits die wichtige Rolle des CRP in der Entwicklung der Atherosklerose als inflammatorischer Erkrankung belegt (Ridker PM et al., 1998, Danesh J et al., 2004), jedoch konnte in jüngsten Studien eine nur moderate Assoziation zwischen dem CRP-Gen und systemischen CRP-Spiegeln (Kathiresan S, 2006, Paj JK, 2008) sowie keine Assoziation zwischen verschiedenen CRP-Polymorphismen und dem kardiovaskulären Risiko gefunden werden (Zacho J, 2008). Bisher haben auch nur wenige Studien den Zusammenhang zwischen den CRP-Rezeptoren und der Koronaren Herzkrankheit untersucht, wobei hierbei keine Assoziation zwischen den Fcγ-Rezeptoren und der KHK als Gesamtheit oder ihrem angiographischen Ausmaß gefunden wurde (Gardemann A, 2003; Gavasso S, 2005). Den Einfluss des FcγRIIa-Polymorphismus auf die Ausprägung entweder einer stabilen oder instabilen Angina pectoris als Erstereignis der KHK wurde bislang jedoch noch nicht untersucht. Nachdem neuere immunologische Studien einen Einfluss des FcγRIIa-Polymorphismus speziell auf den Verlauf der Erkrankungen nachweisen konnten (Manger et al., 2002), fokussierten wir in unseren Analysen auf den Zusammenhang zwischen dem FcγRIIa-Genotyp und den klinischen Verlauf der KHK.

Die hochsignifikanten Unterschiede in der Verteilung des FcγRIIa R/R131-Genotyps zwischen stabiler und instabiler AP können als Erklärung für die unterschiedliche klinische Erstmanifestation fungieren. Da wir jedoch in unserer Pilotstudie überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede der Verteilung des R/R131-

Genotyps zwischen Patienten mit akutem Myokardinfarkt und gesunden Kontrollpatienten finden konnten, vermuten wir dass der FcγRIIa R/R131-Genotyp ein Risikofaktor eher für die Entwicklung einer Plaque-Instabilität sein könnte und weniger für die Plaqueruptur. Diese Hypothese kann sowohl die unterschiedliche Verteilung des R/R131-Subtyps zwischen Patienten mit stabiler und instabiler AP erklären als auch die ähnliche Distribution zwischen Patienten mit akutem Myokardinfarkt und den gesunden Kontrollen. Weiterhin führt die gegensätzliche Distribution des R/R131- und H/H131-Genotyps in den Gruppen IAP und SAP direkt zur ähnlichen Verteilung der Subtypen in der Gesamtgruppe KHK im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz findet sich im Selektionsbias, der sich dadurch ergibt, dass circa 30% aller Patienten mit akutem Myokardinfarkt präklinisch an plötzlichem Herztod und myokardialem Pumpversagen versterben und sich somit unseren Analysen entziehen. Da diejenigen Patienten, die so früh an den Folgen des Myokardinfarktes versterben einen besonders schweren Verlauf des akuten Koronarsyndroms aufweisen, lässt sich vermuten dass unter ihnen der möglicherweise für Instabilität prädisponierender Genotyp R/R131 besonders häufig zugrunde liegt. Um diese Vermutung zu bestätigen müssten allerdings Daten aus der Genotypisierung dieses schwer rekrutierbaren Kollektivs gesammelt werden.

Es ist bereits bekannt dass genetische Unterschiede innerhalb des CRP-Gens für die interindividuelle Variabilität der baseline CRP-Spiegel verantwortlich sind (Szalai et al., 2005). Da der Serum-CRP-Spiegel als starker Prädiktor des kardiovaskulären Risikos fungiert, limitieren diese interindividuellen Unterschiede jedoch seinen klinischen Nutzen als Risikofaktor, da ungewiss bleibt ob leicht elevierte Spiegel auf eine schwelende Infektion oder eine genetische Prädisposition für höhere CRP-Spiegel zurückzuführen sind (Pearson TA et al., 2003). Kathiresan et al. konnten 2006 in ihren Analysen eine Assoziation zwischen dem triallelischen SNP rs 3091244 und einer prävalenden kardiovaskulären Erkrankung ausschließen. Jedoch wurde bisher noch nicht untersucht, ob ein Zusammenhang besteht zwischen SNPs innerhalb des CRP-Genoms und dem Auftreten einer stabilen oder instabilen AP als Erstmanifestation der KHK. Um unsere Analysen zu komplettieren führten wir auch eine Genotypisierung von Patienten mit stabiler und instabiler AP hinsichtlich der Allele C/T/A des triallelischen SNP rs3091244, der Allele C/G des biallelischen

SNP rs 1800947 sowie der Allele A/T des biallelischen SNP rs 1417938 des CRP-Gens durch. Hierbei zeigte sich bei den untersuchten Patienten jeweils eine annähernde Gleichverteilung der Allele bezogen auf das gesunde Kontrollkollektiv, so dass davon ausgegangen werden kann dass existente Polymorphismen innerhalb des CRP-Gens keinen weiteren Einfluss auf den klinischen Verlauf der KHK aufweisen.
Durch diese Daten sowie die Ergebnisse der Multivariaten-Analyse wird zusätzlich die Unabhängigkeit des R/R131-Genotyps als Risikofaktor bestätigt. Es ist also der Genotyp R/R131 an sich und nicht die Interaktion mit Polymorphismen des CRP-Gens, welcher als Risikofaktor der Plaquedestabilisierung fungiert.

FcγRIIa wird auf Endothelzellen, Thrombozyten, T-Zellen, Monozyten, Macrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, welche alle in den Prozess der Atherogenese involviert sind (Ross R 1999, van Sorge NM, 2003). Durch diesen Rezeptor induziert CRP signifikant die Adhäsion zwischen Monozyten und Endothelzellen und erhöht die Expression von Monocyte-Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Endothelin-1 und Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) in Endothelzellen (Verma S, 2006). Montecucco und Kollegen konnten 2008 zeigen, dass CRP die Chemokin-Produktion humaner Monozyten via FcγRIIa und anderen Fcγ-Rezeptoren induziert. Weiterhin ist es bekannt dass CRP die Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen (Nabata A et al., 2008) und die Aktivität des Tissue-Factors (Devaraj S et al., 2008) stimuliert sowie die Produktion inflammatorischer Zytokine ankurbelt. Durch diese Eingriffe in die Atherogenese liegt die Vermutung nahe, dass CRP selbst durch die Interaktion mit FcγRIIa sowie seinen übrigen Rezeptoren endotheliale Zell-Apoptose und Gewebsschädigung induziert, was für die Destabilsierung atherosklerotischer Plaques essentiell ist.

Dadurch dass FcγRIIa R/R131 eine höhere Bindungsaffinität für CRP aufweist als FcγRIIa H/H131 wird der biologische Effekt des CRP entscheidend beeinflusst (Zuniga R et al., 2003). Diese Tatsache könnte bei Personen mit FcγRIIa R/R131 zu einer höheren Konzentration oder auch zu einem stärkeren CRP-mediierten Effekt in atherosklerotischen Läsionen führen, wodurch dieser Genotyp eine genetische Prädisposition für ein größeres Risiko des akuten Koronarsyndrom via Plaqueruptur transportieren könnte.

Unsere Ergebnisse erweitern bisherige Daten über verstärkte Koronarinflammation bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit stabiler AP. Bei Patienten mit instabiler AP konnten Buffon et al. ausgedehnte Inflammation quer über das koronare Gefäßbett nachweisen, unabhängig von der Lokalisation der Primärläsion. Bei Patienten mit stabiler AP war dies nicht zu beobachten. Weiterhin zeigten Liuzzo et al. kürzlich eine spontane CRP-mediierte Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB in vivo bei Patienten mit instabiler AP und in vitro in Monozyten. Zusätzlich wurde bestätigt, dass die weitverbreitete Therapie mit Statinen Fcγ Rezeptor-vermittelte zelluläre Antworten in mononukleären Zellen unterdrückt (Hillyard DZ et al., 2004).

Zum Nachweis der Unabhängigkeit des R/R131-Genotyps als Risikofaktor führten wir zusätzlich eine Multivariaten-Analyse durch, wobei die klassischen atherogenen Risikofaktoren als dichotome Variablen fungierten. Hierbei konnten unsere Ergebnise aus der Genitypisierung bestätigt werden. Das Potential von FcγRIIa R/R131 als angeborener Risikofaktor wird deutlich wenn man ihn mit anderen etablierten atherogenen Risikofaktoren vergleicht (odds ratio=2,86). Vor allem in der Population europäischer Abstammung könnte dieser potente Risikofaktor aufgrund der hohen Frequenz des Risikoallels von Bedeutung sein.

5.2 Ausblick

Zusammenfassend zeigen unsere Daten eine genetische Assoziation des FcγRIIa R/R131-Genotyps mit häufigerem Auftreten einer instabilen Angina pectoris als Erstmanifestation der KHK. Die signifikant differente Verteilung der FcγRIIa-Genvarianten FcγRIIaH/H131, FcγRIIaR/H131 und FcγRIIaR/R131 innerhalb der Patienten mit koronarer Herzkrankheit scheint den Krankheitsverlauf zu beeinflussen und nicht die Manifestation der KHK an sich. Diese Daten suggerieren die Möglichkeit, Patienten mit erhöhtem Risiko der Plaquedestabilisation zukünftig nichtinvasiv durch Genotypisierung hinsichtlich FcγRIIa zusätzlich zur Anamnese, der klinischen Symptomatik sowie der Labordiagnostik zu identifizieren. Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse ist eine signifikant verbesserte

Risikostratifizierung bei Patienten mit KHK. Eine optimierte Risikostratifizierung verspricht immense ökonomische Kostenreduktion bei der KHK als führende Haupttodesursache der industrialisierten Welt, ein frühes Screening des Genotyps könnte eine individualisierte Prophylaxe beziehungsweise Therapie betroffener Patienten ermöglichen.

Es bestehen bereits Modalitäten, über welche der Serum-CRP-Spiegel gesenkt werden kann. Die Gewichtsabnahme bei adipösen Patienten, eine Therapie mit Statinen oder hochdosiertem alpha-Tocopherol scheinen einen Einfluss auf den CRP-Spiegel zu haben (Jilal et al., 2001). Als Zukunftsvision scheint somit additiv zu den klassichen Therapieoptionen auch eine Therapie oder Prophylaxe auf genomischer oder Rezeptorebene möglich.

Nichtsdestotrotz werden noch Daten aus großen prospektiven Studien benötigt werden um den Beitrag des FcγRIIa R/R131 an sich oder in Kombination mit anderen Risikofaktoren zur Identifikation von Hochrisikopatienten zu determinieren.

6 Literaturverzeichnis

1 Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ, Volanakis JE.
Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein.
J Immunol 166 (2001): 3998-4004

2 Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM.
Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death.
Circulation 105 (2002): 2595-2599

3 Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW.
Elevation of C-reactive protein in „active“ coronary artery disease.
Am J Cardiol 65 (1990): 168-172

4 Berman S, Gewurz H, Mold C.
Binding of C-reactive protein to nucleated cells leads to complement activation without cytolysis.
J Immunol 136 (1986): 1354-1359

5 Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW.
The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fcgamma receptor II.
J Exp Med 190 (1999): 585-590

6 Braunwald E.
Unstable angina. A classification.
Circulation 80 (1989): 410-141

7 Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GD, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD.
Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease.
Arterioscler Thromb Vasc Biol (2003); 23: 2063-2069

8 Brundish DE, Baddiley J.
Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate.
Biochem J 110 (1968): 573-582

9 Buchta R, Gennaro R, Pontet M, Fridkin M, Romeo D.
C-reactive protein decreases protein phosphorylation in stimulated human neutrophils.
FEBS Lett. 237 (1988): 173-177

10 Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, DÒnofrio G, Crea F, Maseri A.
Widespread coronary inflammation in unstable angina.
N Engl J Med 347 (2002): 5-12

11 Burke AP, Tracy RP, Kolodgie F, Malcolm GT, Zieske A, Kutys R, Pestander J, Smialek J, Virmani R.
Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies.
Circulation 105 (2002): 2019-2023

12 Carlsson LE, Santoso S, Baurichter G, Kroll H, Papenberg S, Eichler P, Westerdaal NA, Kiefel V, van de Winkel JG, Greinacher A.
Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the Fcgamma RIIa-R-H131 polymorphism.
Blood 92 (1998): 1526-1531

13 Casl MT, Surina B, Glojnaric-Spasic I, Pape E, Jagarinec N, Kranjevic S.
Serum amyloid A protein in patients with acute myocardial infarction.
Ann Clin Biochem 32 (1995): 196-200

14 Ceuppens JL, Baroja ML, Van Vaeck F, Anderson CL.
Defect in the membrane expression of high affinity 72-kD Fc gamma receptors on phagocytic cells in four healthy subjects.

J Clin Invest 82 (1988): 571-578

15 Chen J, Zhao J, Huang J, Su S, Qiang B, Gu D.
-717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associatiated with coronary heart disease in ethnic Han Chinese: the Beijing atherosclerosis study.
JMolMed (2005); 85:72-78

16 Clarkson SB, Kimberly RP, Valinsky JE, Witmer MD, Bussel JB, Nachman RL, Unkeless JC.
Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fc gamma receptor monoclonal antibody.
J Exp Med. 164 (1986): 474-489

17 Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V.
C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary artery disease.
N Engl J Med 350 (2004): 1387-1397

18 Davi G, Patrono C.
Platelet Activation and Atherothrombosis.
NEnglJMed (2007); 357: 2482-94

19 Davies MJ, Woolf N.
Atherosclerosis: what is it and why does it occur?
Br Heart J 69 (1993): 3-11

20 De Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB.
Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein.
J Exp Med 156 (1982): 230-242

21 Dessein PH, Stanwix AE, Joffe BI.
Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis versus osteoarthritis: acute phase response related decreased insulin sensitivity and high-density lipoprotein cholesterol as well as clustering of metabolic syndrome features in rheumatoid arthritis.
Arthritis Res. 4 (2002): R5

22 Dijstelbloem HM, Scheepers RH, Oost WW, Stegemann CA, van der Pol WL, Sluiter WJ, Kallenberg CG, van de Winkel JG, Tervaert JW.
Fcgamma receptor polymorphisms in Wegener`s granulomatosis: risk factors for disease relapse.
Arthritis Rheum 42 (1999): 1823-1827

23 Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RH, Oost WW, Jansen MD, Sluiter WJ, Limburg PC, Derksen RH, van de Winkel JG, Kallenberg CG.
Fc gamma receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes.
Arthritis Rheum 43 (2000): 2793-2800

24 Dong Q, Wright JR.
Expression of c-reactive protein by alveolar macrophages.
J Immunol 156 (1996): 4815-4820

25 Du Clos TW, Zlock LT, Rubin RL.
Analysis of the binding of C-reactive protein to histones and chromatin.
J Immunol 141 (1988): 4266-4270

26 Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W;
The structural biology of expression and function of tissue factor.
ThrombHaemost (1991); 66: 67-79

27 Emsley J, White HE, O`Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP.
Structure of pentameric human serum amyloid P component.

Nature 367 (1994): 338-345

28 Ernst LK, van de Winkel JG, Chiu IM, Anderson CL.
Three genes for the human high affinity Fc receptors for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products.
J Biol Chem 267 (1992): 15692-15700

29 Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM.
Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells.
J Immunol 157 (1996): 541-548

30 Fanger NA, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K, Fisher J, Graziano RF, Pfefferkorn LC, Guyre PM.
Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed an human blood dendritic cells.
J Immunol 158 (1997): 3090-3098

31 Fröhlich M, Sund M, Russ S, Hoffmeister A, Fischer HG, Hombach V, Koenig W.
Seasonal variations of rheological and hemostatic parameters and acute-phase reactants in young, healthy subjects.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (1997): 2692-2697

32 Gabay C, Kushner I.
Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.
N Engl J Med 340 (1999): 448-454

33 Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P.
Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnarable regions of human atherosclerotic plaques.
J Clin Invest 94 (1994): 2493-2503

34 Galve-de Rochemonteix B, Wiktorowicz K, Kushner I, Dayer JM.
C-reactive protein increases production of IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF-alpha, and expression of mRNA by human alveolar macrophages.
J Leukoc Biol 53 (1993): 439-445

35 Gardemann A, Horstmann A, Santoso S.
Fcgamma RIIa-R131H polymorphism: its impact on coronary heart disease in a German cohort.
Thromb Haemost 90 (2003): 1218-1220

36 Gavasso S, Nygard O, Pedersen ER, Aarseth JH, Bleie O, Myhr KM, Vedeler CA.
Fcgamma receptor IIIA polymorphism as a risk-factor for coronary artery disease.
Atherosclerosis 180 (2005): 277-282

37 Gavin AL, Wines BD, Powell MS, Hogarth PM.
Recombinant soluble Fc gamma RII inhibits immune complex precipitation.
Clin Exp Immunol. 102 (1995): 620-625

38 Gavin AL, Tan PS, Hogarth PM.
Gain-of-function mutations in FcgammaRI of NOD mice: implications for the evolution of the Ig superfamily.
EMBO J 17 (1998): 3850-3857

39 Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB.
C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity.
J Exp Med 192 (2000): 1353-1364

40 Ghetie V, Ward ES.
Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn.

Annu Rev Immunol 18 (2000): 739-766

41 Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M.
Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo.
Am J Pathol 152 (1998): 353-358

42 Glass CK, Witztum JL.
Atherosclerosis: the road ahead.
Cell 104 (2001): 503-516

43 Hack CE, Wolbink GJ, Schalkwijk C, Speijer H, Hermens WT, van den Bosch H.
A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells.
Immunol Today 18 (1997): 111-115

44 Harding SA, Sarma J, Josephs DH;
Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers.
Circulation (2004); 109: 1926-9

45 Hauser SL, Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Jameson JL;
Harrison`s Principles of Internal Medicine, 16th Edition.
McGraw-Hill Medical Publishing Division
New York, 2005; 2607 Seiten

46 Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB.
Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group.
Lancet (1997) 15: 462-466

47 Heuertz RM, Tricomi SM, Ezekiel UR, Webster RO.
C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement.
J Biol Chem 274 (1999): 17968-17974

48 Hillyard DZ, Cameron AJ, McDonald KJ, Thomson J, MacIntyre A, Shiels PG, Panarelli M, Jardine AG.
Simvastatin inhibits lymphocyte function in normal subjects and patients with cardiovascular disease.
Atherosclerosis 175 (2004): 305-313

49 Horowitz GL, Beckwith BA, Ridker PM, Buring JE, Rifai N.
C-Reactive Protein in the Prediction of Cardiovascular Disease.
N Engl J Med 343 (2000): 512-513

50 Huizinga TW, Roos D, von dem Borne AE.
Neutrophil Fc-gamma receptors: a two-way bridge to the immune system.
Blood 75 (1990): 1211-1214

51 Jefferis R, Kumararatne D.
Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance.
Clin Exp Immunol 81 (1990): 357-367

52 Jilal I, Devaraj S.
Inflammation and atherosclerosis. The value of the high-sensitivity C-reactive protein assay as a risk marker.
Am J Clin Pathol 116 (2001): 108-115

53 Junghans RP, Anderson CL.
The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996): 5512-5516

54 Kathiresan S, Larson MG, Vasan RS, Guo CY, Gona P, Keaney Jr JF, Wilson PWF, Newton-Cheh C, Musone SL, Camargo AL, Drake JA, Levy D, O`Donnell CJ, Hirschhorn JN, Benjamin EJ;
Contribution of Clinical Correlates and 13 C-Reactive Protein Gene Polymorphisms to Interindividual Variability in Serum C-Reactive Protein Level.
Circulation (2006); 113: 1415-1423

55 Kilpatrick JM, Volanakis JE.
Opsonic properties of C-reactive protein. Stimulation by phorbol myristate acetate enables human neutrophils to phagocytize C-reactive protein-coated cells.
J Immunol 134 (1985): 3364-3370

56 Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M.
Fc gammaRIIIa- 158/V polymorphism influences the binding of igG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype.
Blood 90 (1997): 1109-1114

57 Koenig W, Löwel H, Baumert J, Meisinger C.
C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany.
Circulation 109 (2004): 1349-1353

58 Lange LA, Carlson CS, Hindorff LA, Lange EM, Walston J, Durda JP, Cushman M, Bis JC, Zeng D, Lin D, Kuller LH, Nickerson DA, Psaty BM, Tracy RP, Reiner AP;
Association of Polymorphisms in the CRP-Gene With Circulating C-reactive protein-Levels and Cardiovascular Events.
JAMA (2006); 296: 2703-2711

59 Lanier LL, Phillips JH, Testi R.
Membrane anchoring and spontaneous release of CD 16 (FcR III) by natural killer cells and granulocytes.
Eur J Immunol 19 (1989): 775-778

60 Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ.
Variant genotypes of the low-affinity Fcgamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcgamma receptor polymorphisms in control and disease polulations.
Blood 94 (1999): 4220-4232

61 Lei K-J, Liu T, Zon G, Soravia E, Liu T-Y, Goldman ND,
Genomic DNA sequence for human C-reactive protein.
J Biol Chem (1985); 260: 13377-13383

62 Leonard EJ, Yoshimura T.,
Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)
Immunol Today 11 (1990): 97-101

63 Libby P:
Molecular bases of the acute coronary syndromes.
Circulation (1995) 91: 2844-2850

64 Libby P:
Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: Inflammation, thrombosis, and stabilization.
Am J Cardiol (2000) 86: 3J-8J

65 Libby P:
Concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes.
Circulation 104(2001): 365-372

66 Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L.
Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease.
N Engl J Med 343 (2000): 1139-1147

67 Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A.
The prognostic value of c-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina.
N Engl J Med 331 (1994): 417-424

68 Liuzzo G, Santamaria M, Biasucci LM, Narducci M, Colafrancesco V, Porto A, Brugaletta S, Pinnelli M, Rizzello V, Maseri A, Crea F.
Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation.
J Am Coll Cardiol 49 (2007): 185-194

69 Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Boucier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P.
Funktional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and macrophages: Implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis.
Proc Natl Acad Sci 94 (1997): 1931-1936

70 MacIntyre SS, Kushner I, Samols D.
Secretion of C-reactive protein becomes more efficient during the course of acute phase response.
J Biol Chem 260 (1985): 4169-4173

71 Manger K, Repp R, Jansen M, Geisselbrecht M, Wassmuth R, Westerdaal NA, Pfahlberg A, Manger B, Kalden JR, van de Winkel JG.

Fcgamma receptor IIa, IIIa, and IIIb polymorphisms in German patients with systemic lupus erythematosus: association with clinical symptoms.
Ann Rheum Dis 61 (2002): 786-792

72 Marnell LL, Mold C, Volzer MA, Burlingame RW, Du Clos TW.
C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells.
J Immunol 155 (1995): 2185-2193

73 Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM.
Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects.
Clin Chem 47 (2001): 426-430

74 Mold C, Kingzette M, Gewurz H.
C-reactive protein inhibits pneumococcal activation of the alternative pathway by increasing the interaction between factor H and C3b.
J Immunol 133 (1984): 882-885

75 Montecucco F, Steffens S, Burger F, Pelli G, Monaco C, Mach F.
C-reactive protein (CRP) induces chemokine secretion via CD 11b/ICAM-1 interaction in human adherent monocytes.
J Leukoc Biol 84 (2008): 1109-1119

76 Morgan AW, Griffifths B, Ponchel F, Montague BM, Ali M, Gardner PP, Gooi HC, Situnayake RD, Markham AF, Emery P, Isaacs JD.
Fcgamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups.
Arthritis Rheum 43 (2000): 2328-2334

77 Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E.
C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. Thrombolysis in Myocardial Infarction.

J Am Coll Cardiol 31 (1998): 1460-1465

78 Mortensen RF, Duszkiewicz JA.
Mediation of CRP-dependent phagocytosis through mouse macrophage Fc-receptors.
J Immunol 119 (1977): 1611-1616

79 Mullenix MC, Mortensen RF.
Calcium ion binding regions in C-reactive protein: Location and regulation of conformational changes.
Mol Immunol 31 (1994): 615-622

80 Murphy A, White A, Nair R, Kingwell B, Duffy S, Chin-Dusting J, Woollard K.
C-reactive protein and Fcgamma RIIa functional polymorphisms are not associated with clinical presentation of stable and unstable angina.
Thromb Haemost 97 (2007): 681-682

81 Myhr KM, Raknes G, Nyland H, Vedeler C.
Immunoglobulin G Fc-receptor (FcgammaR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS.
Neurology 52 (1999): 1771-1776

82 Nabata A, Kuroki M, Ueba H, Hashimoto S, Umemoto T, Wada H, Yasu T, Saito M, Momomura S, Kawakami M.
C-reactive protein induces endothelial cell apoptosis and matrix metalloproteinase-9 production in human mononuclear cells: Implications for the destabilization of atherosclerotic plaque.
Atherosclerosis 196 (2008): 129-135

83 Osmand AP, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, Shelton E.
Characterization of c-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins).
Proc Natl Acad Sci USA 74 (1977): 739-743

84 Pai JK, Mukamal KJ, Rexrode KM, Rimm EB.
C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms, CRP levels, and risk of incident coronary heart disease in two nested case-control studies.
PloS ONE 1 (2008): e1395

85 Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC, Arts J, Westerdaal NA, Vlug A, Capel PJ, Aarden LA, van de Winkel JG.
On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2.
J Clin Invest 90 (1992): 1537-1546

86 Pasceri V, Chang J, Willerson JT; Yeh ETH.
Modulation of C-Reactive Protein-Mediated Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induction in Human Endothelial Cells by Anti-Atherosclerosis Drugs.
Circulation 103 (2001): 2531-2534

87 Pepys J, Longbottom JL.
Antigenic and C-substance activities of related glycopeptides from fungal, parsitic and vegetable sources.
Int Arch Allergy Appl Immunol 41 (1971): 219-221

88 Pepys MB, Booth SE, Tennent GA, Butler PJ, Williams DG.
Bindings of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonuclein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli.
Clin Exp Immunol 97 (1994): 152-157

89 Pepys MB, Hirschfield GM.
C-reactive protein: a critical update.
J Clin Invest 111 (2003): 1805-1812

90 Person TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO III, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F;
Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association.
Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice.
Circulation (2003); 107: 499-511

91 Quinn MT, Parthasarathy S; Fong LG, Steinberg D.,
Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.
Proc Natl Acad Sci USA 84 (1987): 2995-98

92 Raknes G, Skeie GO, Gilhus NE, Aadland S, Vedeler C.
FcgammaRIIA and FcgammaRIIIB polymorphisms in myasthenia gravis.
J Neuroimmunol 81 (1998): 173-176

93 Rapaport SI, Rao LV.
Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation.
Arterioscler Thromb 12 (1992): 1111-1121

94 Rapaport SI.
Blood coagulation and its alterations in hemorrhagic and thrombotic disorders.
West J Med 158 (1993): 153-161

95 Rascu A, Repp R, Westerdaal NA, Kalden JR, van de Winkel JG.
Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms.
Ann N Y Acad Sci 5 (1997): 282-295

96 Retterstol L, Eikvar L, Bohn M, Bakken A, Erikssen J, Berg K.
C-reactive protein predicts death in patients with previous premature myocardial infarction—a 10 year follow-up study.
Atherosclerosis 160 (2002): 433-440

97 Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH.
Inflammation, aspirin and the risk of cardiovaskular disease in apparently healthy men.
N Engl J Med 336 (1997): 973-979 [Erratum: N Engl J Med 337 (1997): 336]

98 Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH.
Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women.
Circulation 98 (1998): 731-733

99 Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N.
C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women.
N Engl J Med 342 (2000): 836-843

100 Rosenfeld ME, Ross R.
Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits.
Atherosclerosis 10 (1990): 680-687

101 Ross R,
Atherosclerosis – an inflammatory disease
N Engl J Med 340 (1999): 115-126

102 Roux KH, Kilpatrick JM, Volanakis JE, Kearney JF.
Localization of the phosphocholine-binding sites on C-reactive protein by immunoelectron microscopy.
J Immunol 131 (1983): 2411-2415

103 Salmon JE, Millard SS, Brogle NL, Kimberly RP.
Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant-dependent and allele-sensitive manner.
J Clin Invest 95 (1995): 2877-2885

104 Sambrook J, Russell DW,
Spectrophotometry of DNA or RNA.
Molecular Cloning . Third edition 3: A8.20-A8.21

105 Sanders LA, van de Winkel JG, Rijkers GT, Voorhorst-Ogink MM, de Haas M, Capel PJ, Zegers BJ.
Fc gamma receptor IIa (CD 32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections.
J Infect Dis 170 (1994): 854-861

106 Sanders LA, Feldmann RG, Voorhorst-Ogink MM, de Haas M, Rijkers GT, Capel PJ, Zegers BJ, van de Winkel JG.
Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD 32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils.
Infect Immun 63 (1995): 73-81

107 Sautès C, Varin N, Hogarth PM, Unkeless JC, Teillaud, C, Even J, Lynch A, Frisman WH.
Molecular and functional studies of recombinant soluble Fc gamma receptors.
Mol Immunol 27 (1990): 1201-1207

108 Serino L, Virji M.
Phosphorylcholine decoration of lipopolysaccharide differentiates commensal Neisseriae from pathogenic strains: identification of licA-type genes in commensal Neisseriae.
Mol Microbiol 35 (2000): 1550-1559

109 Shah PK, Galis ZS:
Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain.
Circulation (2001); 104(16): 1878-80

110 Siegel J, Osmand AP, Wilson MF, Gewurz H.
Interactions of C-reactive protein with the complement system. II C-reactive protein-mediated consumption of complement by poly-L-lysine polymers and other polyactions.
J Exp Med 142 (1975): 709-721

111 Simister NE, Mostov KE.
An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens.
Nature 337 (1989): 184-187

112 Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, Stampfer MJ, Curhan GC.
Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis.
Circulation 107 (2003): 1303-1307

113 Stein MP, Edberg JC, Kimberly RP, Mangan EK, Bharadwaj D, Mold C, Du Clos TW.
C-reactive protein binding to FcgammaRIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific.
J Clin Invest 105 (2000): 369-376

114 Steinberg D.
Low density lipoprotein oxidation and ist pathobiological significance
J Biol Chem 272 (1997): 20963-66

115 Stopeck AT, Nicholson AL, Mancini FP, Hajjar DP.
Cytokine regulation of low density lipoprotein-receptor-gene transcription in Hep G2-cells
J Biol Chem 1993; 268: 17489-94

116 Story CM, Mikulska JE, Simister NE.
A major histocompatibility complex class I-like Fc-receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus.
J Exp Med 180 (1994): 2377-2381

117 Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE.
Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from Streptococcus pneumoniae.
Infect Immun 64 (1996):4850-4853

118 Szalai AJ, van Ginkel FW, Wang Y, McGhee JR, Volanakis JE.
Complement-dependent acute-phase expression of c-reactive protein and serum amyloid P-component.
J Immunol 165 (2000): 1030-1035

119 Szalai AJ, Wu J, Lange EM, McCrory MA, Langefeld CD, Williams A, Zakharkin SO, George V, Allison DB, Cooper GS, Xie F, Fan Z, Edberg JC, Kimberly RP;
Single nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level.
J Mol Med (2005); 83: 440-447

120 Szalai AJ, McCrory MA, Cooper GS, Wu J, Kimberly RP;
Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene.
Genes and Immunity (2002); 3: 14-19

121 Szalai AJ, Alarcon GS, Calvo-Alen J, Toloza SMA, McCrory MA, Edberg JC, McGwin G, Bastian HM, Fessler BJ, Vila LM, Kimberly RP, Reveille JD
Systemis lupus erythematosus in a multiethnic US Cohort (LUMINA).XXX: association between C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms and vascular events.

Rheumatology (2005); 44: 864-868

122 Tebo JM, Mortensen RF.
Internalization and degradation of receptor-bound C-reactive protein by U-937 cells: induction of H2O2 production and tumoricidal activity.
Biochim Biophys Acta 1095 (1991): 210-216

123 Toniatti C, Arcone R, Majello B, Ganter U, Arpaia G, Ciliberto G.
Regulation of the human c-reactive protein gene, a major marker of inflammation and cancer.
Mol Biol Med 7 (1990): 199-212

124 Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, Koenig W, Waltenberger, Fitzsimmons C, Hombach V.
C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 18 (1998): 1386-1392

125 Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J.
C-reactive protein in the arterial intima: role of c-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 20 (2000): 2094-2099

126 Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ.
Tissue factor modulates the thrombogenicitiy of human atherosclerotic plaques.
Circulation (1997) 95: 594-599

127 Tridandapani S, Siefker K, Teillaud JL, Carter JE, Wewers MD, Anderson CL.
Regulated expression and inhibitory function of Fc gamma RIIb in human monocytic cells.
J Biol Chem 277 (2002): 5082-5089

128 Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P, for the WHO MONICA (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Project. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations.
Lancet 353 (1999):1547-57

129 Van de Winkel JG, Capel PJ.
Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications.
Immunol Today 14 (1993): 215-221

130 Van de Winkel JG, de Wit TP, Ernst LK, Capel PJ, Ceuppens JL.
Interaction of human monocyte Fc gamma receptors with rat IgG2b. A new indicator for the Fc gamma RIIa (R-H131) polymorphism.
J Immunol 154 (1995): 1852-1860

131 Van der Pol WL, van de Winkel JG.
Immunology in clinical practice. X. IgG receptors: structure, function and immunotherapy.
Ned Tijdschr Geneeskd 142 (1998): 335-340

132 Van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG.
FcgammaR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy.
Tissue Antigens 61 (2003): 189-202

133 Van Vugt MJ, Kleijmeer MJ, Keler T, Zeelenberg I, van Dijk MA, Leusen JH, Geuze HJ, van de Winkel JG.
The FcgammaRI (CD64) ligand binding chain triggers major histocompatibility complex class II antigen presentation independently of its associated FcR gamma-chain.
Blood 94 (1999): 808-817

134 Verma S, Devaraj S, Jilal I.
Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis.
Circulation 113 (2006): 2135-2150

135 Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA.
Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein.
Circulation 105 (2002): 1890-1896

136 Volanakis JE.
Human C-reactive protein: expression, structure, and function.
Mol Immunol 38 (2001): 189-197

137 Volanakis JE, Kaplan MH.
Interaction of C-reactive protein complexes with complement system. II. Consumption of guinea pig complement by CRP complexes: requirement for human C1q.
J Immunol 113 (1974): 9-17

138 Warmerdam PA, van de Winkel JG, Gosselin EJ, Capel PJ.
Molecular basis for a polymorphism of human Fc gamma receptor II (CD 32).
J Exp Med 172 (1990): 19-25

139 Weiser JN, Shchepetov M, Chong ST.
Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable charactaristic of Haemophilus influenzae.
Infect Immun 65 (1997): 943-950

140 Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski,
Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.
Bio Techniques 22 (1997): 474-481

141 Woo P, Korenberg JR, Whitehead AS
Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary sequence of serum amyloid P component.
J Biol Chem (1985); 260: 13384-13388

142 Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL.
Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques.
Am J Pathol 158 (2001): 1039-1051

143 Yue CC, Muller-Greven J, Dailey P, Lozanski G, Anderson V, Macintyre S.
Identification of a c-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining c-reactive protein within the endoplasmatic reticulum.
J Biol Chem 271 (1996): 22245-22250

144 Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Nordestgaard BG.
Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vescular disease.
N Engl J Med 359 (2008): 1897-1908

145 Zee RY, Ridker PM,;
Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis.
Atherosclerosis (2002); 162: 217-219

146 Zuniga R, Markowitz GS, Arkachaisri T, Imperatore EA, D`Agati VD, Salmon JE.
Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: the relationship between the composition of immune deposits and Fcgamma receptor type IIA alleles.
Arthritis Rheum 48 (2003): 460-470

147 Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J.
C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis.
Circulation 103 (2001): 1194-1197

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
AKS	Akutes Koronarsyndrom
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AS	Aminosäure
AP	Angina pectoris
bp	Basenpaar
BMI	Body mass index
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
CI	Confindence Interval
CK	Kreatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular Disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EKG	Elektrokardiogramm
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor
H	Histidin
HDL	High-Density Lipoproteine
IAP	Instabile Angina pectoris
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activator motifs
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motifs
kDa	Einheit für Molekulare Masse in Kilo Daltons
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density Lipoproteine

MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MHC	Major histocompatibility complex
MIRR	multichain immune recognition receptor
ml	Mililiter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µ	micro
µl	Mikroliter
NF-κB	nuclear transcription factor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Non-CAD	Kontrollkollektiv
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
p	Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit
PAI	plasminogen activator inhibitor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCh	Phosphocholin
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PMN	Polymorphonuclear Leukocytes
PGE	Prostaglandin E
R	Arginin
rpm	revolutions per minute
SAP	Stabile Angina pectoris
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
T	Tyrosin
TF	Tissue Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor

vs	versus
vWF	von-Willebrand Faktor

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem Klinikdirektor der Medizinischen Klinik II der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg - Herrn Prof. Dr. med. W.G. Daniel - danke ich für die Möglichkeit zur Promotion an seiner Klinik und Forschungstätigkeit in seinem Labor für Molekulare Kardiologie.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Garlichs sowie meiner Betreuerin Frau Dr. med. Dorette Raaz-Schrauder für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr wertvolle Anleitung und Förderung während der gesamten Dauer der Arbeit. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für Molekulare Kardiologie bin ich für ihre umfassende Mithilfe zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. A. Reis und Herrn Dr. rer. nat. A. Ekici aus der Humangenetik sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. M. Herrmann aus der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums danke ich für die exzellente Zusammenarbeit. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Lutz Klinghammer für die Unterstützung bei den statistischen Analysen.

Von Herzen möchte ich mich zuletzt bei meinen Eltern bedanken, Frau Anna und Herrn Manfred Schüsser, für die Ermöglichung meines Werdegangs, die fortwährende Motivation und nie endende Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Monika Barbara Kallmünzer, geb. Schüsser
Geburtsdatum/-ort:	02.10.1981 in Ehringshausen
Eltern:	Manfred Schüsser
	Anna Schüsser, geb. Axente
Geschwister:	Anne-Karin Schüsser
Familienstand:	Verheiratet mit Dr. med. Bernd Kallmünzer
Kinder:	Alexander Johannes Kallmünzer
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schulbildung:

1988-1992	Birkenwald Grundschule, Nürnberg
1992-2001	Gymnasium Stein
Juni 2001	Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

2001-2007	Studium der Humanmedizin an der FAU Erlangen-Nürnberg
August 2003	Ärztliche Vorprüfung
2006-2007	Praktisches Jahr an der FAU Erlangen-Nürnberg und dem akademischen Lehrkrankenhaus Schwabach
Dezember 2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin
Studienbegleitend	Promotion an der Medizinischen Klinik II der FAU Erlangen-Nürnberg Direktor: Prof. Dr. med. W.G. Daniel

Berufstätigkeit:

seit April 2008	Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik 8 des Klinikums Nürnberg Chefarzt: Prof. Dr. med. M. Pauschinger